This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

**Usage guidelines**

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.

+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.

+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.

+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

**About Google Book Search**

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

**Über dieses Buch**

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

**Nutzungsrichtlinien**

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.

+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.

+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.

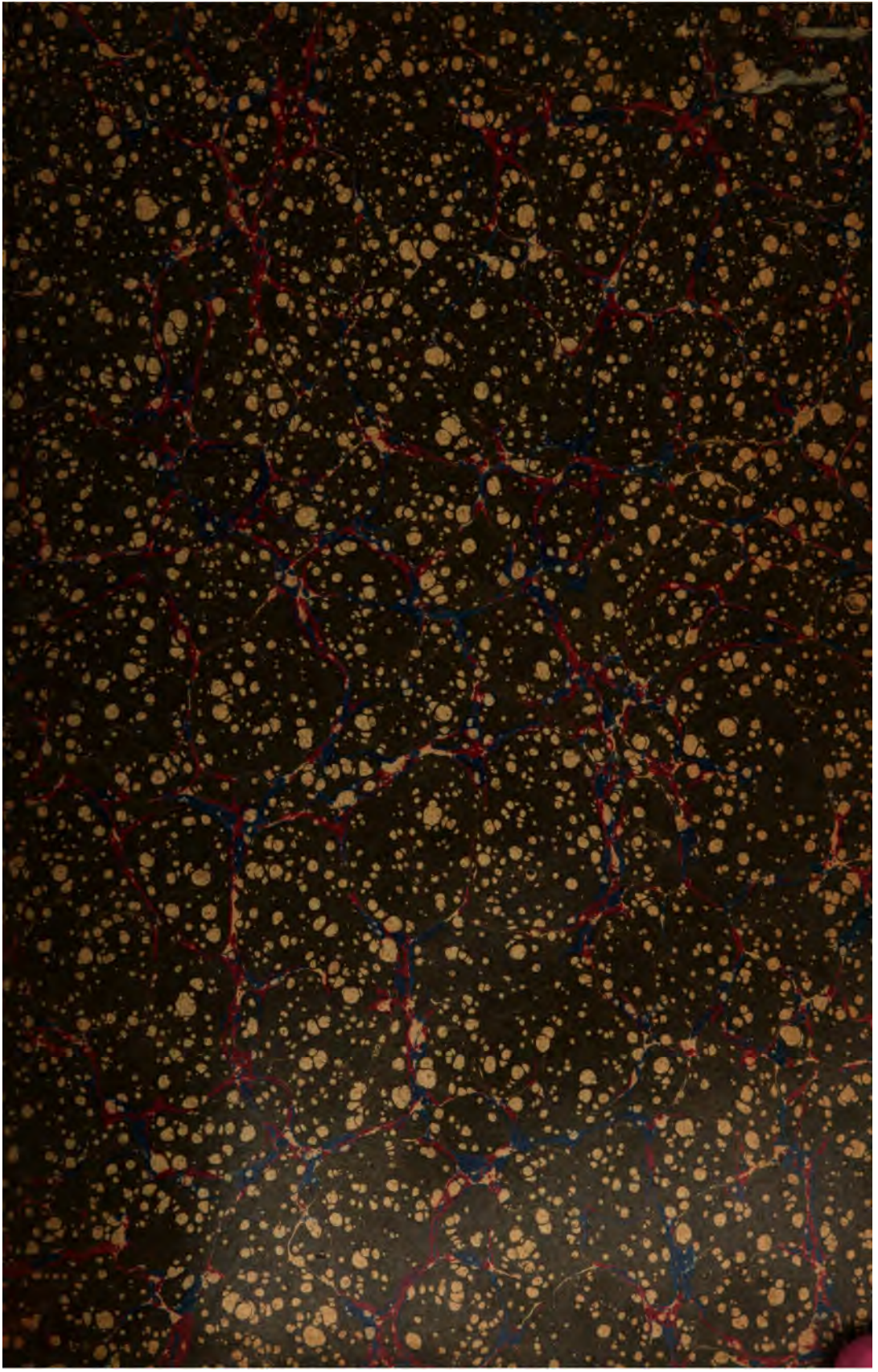
+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

**Über Google Buchsuche**

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

UC-NRLF
$B 96 859

Y.C 88544



14.
29263

# DIE METHODEN

DER

# BAKTERIEN-FORSCHUNG

VON

DR. FERDINAND HUEPPE,
Docent der Hygiene und Bakteriologie am chemischen Laboratorium von R. Fresenius zu Wiesbaden.

MIT 2 TAFELN IN FARBENDRUCK UND 31 HOLZSCHNITTEN.

WIESBADEN.
C. W. KREIDEL'S VERLAG.
1885.

203917

# W. & H. Seibert,

optisches Institut

in

## Wetzlar.

# Mikroskope

für alle wissenschaftlichen Zwecke.

Für Untersuchung auf

## Mikro-Organismen

besonders eingerichtet sind folgende:

No. 3, grobe Einstellung mittelst Trieb, Gelenk zur Schiefstellung, drehbarer Objecttisch mit Gradtheilung, Beleuchtungs-Apparat nach Abbé, Objective I, III, V und homogene Immersion $^1/_{12}$, 3 Oculare mit Mikrometer. Preis: Mk. 475.

No. 5, grobe Einstellung mittelst freier Tubusschiebung, Beleuchtungs-Apparat, Objective II, V und homogene Immersion $^1/_{12}$, 3 Oculare mit Mikrometer, Preis: Mk. 370.

No. 7, grobe Einstellung mittelst freier Tubusschiebung, Beleuchtungs-Apparat, Objective II, V und homogene Immersion $^1/_8$, 2 Oculare. Preis: Mk. 254.

---

*Ausführliche illustr. Kataloge auf Wunsch gratis und franco.*

# DIE METHODEN

DER

# BAKTERIEN-FORSCHUNG

VON

DR FERDINAND HUEPPE.

Docent der Hygiene und Bakteriologie am chemischen Laboratorium von R. Fresenius zu Wiesbaden.

---

MIT 2 TAFELN IN FARBENDRUCK UND 31 HOLZSCHNITTEN.

---

WIESBADEN.

C. W. KREIDEL'S VERLAG.

1885.

QR65
H?
BIOLOGY
LIBRARY
G

Das Recht der Übersetzung bleibt vorbehalten.

Druck von Carl Ritter in Wiesbaden.

HERRN

GEHEIMEN REGIERUNGSRATH

DR. ROBERT KOCH

IN

DANKBARER VEREHRUNG

GEWIDMET.

# Vorwort.

Dem Mangel einer zusammenfassenden Darstellung über die Methoden der Bakterien-Forschung habe ich, mitbestimmt durch die Wünsche meines hochverehrten Lehrers, Herrn Geheimrath Koch, im vorliegenden Werke zu begegnen versucht. Bei der ausserordentlich zerstreuten, zum Theil nur schwer zugänglichen Litteratur war es mein Bestreben an der Hand historischer und experimenteller Kritik das ganze Material zu sichten, das Gute aller Bestrebungen aus dem kaum noch übersehbaren Gewirre von brauchbaren und unbrauchbaren Mittheilungen herauszuarbeiten, um dem selbstständigen Forscher ein brauchbares Handbuch, dem Anfänger eine zuverlässige Einführung in das Gebiet geben zu können.

Wiesbaden, Februar 1885.

**Der Verfasser.**

# Inhaltsverzeichniss.


| | | Seite. |
|---|---|---|
| Vorwort | | V |
| Einleitung. Stellung der Aufgabe | | 1 |
| **I.** | **Generatio spontanea und die Principien der Sterilisation** | 6 |
| **II.** | **Form der Bakterien und mikroskopische Technik** | 17 |
| | Nachweis der Bakterien im ungefärbten Zustande | 22 |
| | Färbung der Bakterien | 27 |
| | Allgemeine Principien der Färbung | 29 |
| | Herstellung der Farblösungen | 34 |
| | Andere Reagentien und Utensilien | 37 |
| | Deckglas-Präparate | 40 |
| | Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum | 45 |
| | Die Untersuchung des Blutes auf Bakterien | 51 |
| | Färbung der Sporen | 56 |
| | Schnitt-Präparate | 59 |
| | Isolirte Färbung | 63 |
| | Doppelfärbungen | 64 |
| | Epiphytische Bakterien | 68 |
| | Andere Mikroorganismen | 69 |
| **III.** | **Kultur-Methoden; Reinkulturen** | 71 |
| | 1. Durchsichtige flüssige Nährmedien | 71 |
| | 2. Die fractionirten Kulturen | 78 |
| | 3. Undurchsichtige, feste Nährsubstrate | 79 |
| | 4. Die Gelatinekulturen von Klebs und Brefeld; Ausgang von einem Keime; feuchte Kammern | 82 |
| | 5. Verdünnungsmethode; Zählkammern | 88 |
| | Erhitzungsmethode | 94 |
| | 6. Kulturen in Haarröhrchen nach Salomonsen | 95 |
| | 7. Die Infections-Methode | 98 |
| | 8. Die Kulturen auf durchsichtigem festen Nährboden nach Koch | 101 |

Seite.

A. Durchsichtige, feste Substrate durch Zusatz gelatinirender Substanzen; Nährgelatine . . . . . 104
a. Objectträgerkulturen . . . . . 106
b. Plattenkulturen . . . . . 109
c. Reagirglaskulturen . . . . . 113
Grenzen der Gelatine; Agar-Agar . . . . . 115
Improvisiren . . . . . 116
B. Durchsichtige, feste Substrate ohne Zusatz gelatinirender Substanzen; Blutserum . . . . . 118
Gewinnung eines reinen Ausgangsmaterials für die Blutserumkulturen . . . . . 122
Der Gang der Kultur . . . . . 125
Die Reinkultur als das saprophytische Studium parasitischer Bakterien . . . . . 127

**IV. Uebertragungen zum Nachweise der causalen Beziehungen der Bakterienvegetation zu Zersetzungen und Krankheiten** 128
A. Saprophytische Bakterien . . . . . 128
Anaerobiose . . . . . 130
B. Parasitische Bakterien . . . . . 138
Inhalationsversuche . . . . . 139
Fütterungsversuche . . . . . 140
Cutane Impfung . . . . . 142
Subcutane Application . . . . . 143
Injection in die Blutbahn . . . . . 144

**V. Allgemeine biologische Aufgaben** . . . . . 147
Enzyme . . . . . 149
Ptomaine . . . . . 150
Verhalten zur Temperatur . . . . . 151
Die Reinkultur als epidemiologisches Experiment . . . . 154
Entwicklungshemmung, Abschwächung, Vernichtung . . . 155
Desinfection mit Flüssigkeiten und Gasen . . . . . 156
Austrocknen, Kälte, Druck . . . . . 158
Electricität, Phosphorescenz, Licht . . . . . 159

**VI. Specielle hygienische Untersuchungen** . . . . . 160
A. Boden . . . . . 160
B. Wasser . . . . . 162
C. Luft . . . . . 164

**VII. Die Bakteriologie als Lehrgegenstand** . . . . . 168

# Einleitung.

Die Ausbildung besonderer Methoden zum Studium der Bakterien wurde bedingt einerseits durch die Kleinheit und schnelle Vermehrung dieser niederen Organismen, bei denen die sonst in der Morphologie bewährten Methoden fast ganz im Stiche liessen, und andererseits durch die biologischen Prozesse, bei welchen sich diese Mikroorganismen betheiligen und denen auch die Methodik Rechnung zu tragen gezwungen wurde.

In Hinsicht auf die Biologie lassen sich die Bakterien in zwei grosse Gruppen trennen: die Saprophyten, welche sich von todten organischen Körpern nähren, und die Parasiten, welche lebende Organismen befallen.

Unter den Saprophyten scheidet man meist die eigentlichen Fäulnissbakterien von denjenigen, welche eine mehr typische Zersetzung der nicht lebenden organischen Materie bewirken, sodass selbst eine technische Gewinnung der gebildeten Produkte ermöglicht wird. Diese letzteren Saprophyten bezeichnet man als Gährungs- oder Fermentbakterien. Ausserdem machen sich unter den Saprophyten noch die Pigmentbakterien besonders bemerkbar.

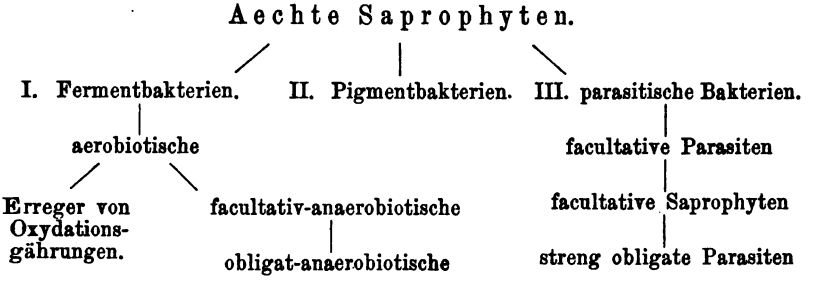
Viele dieser Saprophyten bedürfen des Luftsauerstoffs zum Leben und Wirken unter allen Umständen: aerobiotische. Manche Arten können denselben zeitweilig entbehren und sollen gerade dann befähigt sein die specifischen Zersetzungen auszuüben, vermehren sich aber und leben auch bei freiem Luftzutritt; man könnte sie facultativ-anaerobiotische nennen. Wieder von anderen Arten ist behauptet worden, dass die Abwesenheit von Luftsauerstoff zu ihrem Leben und Wirken nothwendig sei, dass sie durch

den Luftsauerstoff geradezu getödtet würden: obligat-anaerobiotische. Noch andere Arten kennen wir, bei denen im geraden Gegentheil hierzu mit der Lebensthätigkeit eine Uebertragung von Sauerstoff auf das Substrat vor sich geht: sie erregen Oxydationsgährungen.

Unter den parasitisch lebenden Bakterien giebt es Arten, welche zur vollen Entwickelung durchaus nicht auf den thierischen Organismus angewiesen sind, sondern nur gelegentlich als Parasiten auftreten oder nur einen Theil ihrer Entwickelung im lebenden Organismus durchmachen: van Tieghem's facültative Parasiten. Andere Arten finden in der Regel nur im lebenden Organismus alle Lebensbedingungen, können aber gelegentlich oder in bestimmten Stadien der Entwickelung auch saprophytisch leben: de Bary's facultative Saprophyten. Noch andere Arten endlich scheinen nur der parasitischen Lebensweise angepasst und ganz unfähig zu sein, noch in irgend einem Stadium saprophytisch aufzutreten; diese nennt de Bary streng-obligate Parasiten. Wenn es auch im einzelnen Falle oft recht schwer sein mag zu bestimmen, ob ein parasitischer Mikroorganismus dieser oder jener Gruppe angehört, wenn in solchen Fällen auch die Erkennung feiner Differenzen mehr oder weniger abhängig bleibt von dem subjectiven Urtheile des Beobachters, so gestattet diese Gruppirung doch viel zwangloser den realen Verhältnissen gerecht zu werden, als die nur die Extreme berücksichtigende Eintheilung der pathogenetischen, infectiösen Mikroorganismen in ektogene und endogene. Diese letzteren Bezeichnungen gestatten nur ungenügend die Ermittelungen über die Hülfsursachen der Infectionskrankheiten zu verwerthen oder führen zu einer höchst einseitigen Hervorhebung des einen oder anderen Faktors, aber nicht zu einer unbefangenen Beurtheilung aller für die Aetiologie wichtigen Momente. Auch unter den parasitischen Bakterien ist das Sauerstoffbedürfniss ein höchst differentes. Dann ist zu beachten, dass die Parasiten endophytisch im Inneren der Organe oder Zellen leben können, oder vielleicht auch epiphytisch auf der Aussenfläche des Wirthes.

Diese verschiedenen Anpassungserscheinungen lassen sich theoretisch herleiten aus der einfach saprophytischen Lebensweise, wobei

aber zu beachten ist, dass directe Zwischenglieder selten nachweisbar sind und einzelne Arten verschiedene Wirkungen ausüben können.




Die allgemeinste Aufgabe, welche der Bakterienforschung gestellt ist, lässt sich nun kurz dahin präcisiren, zu bestimmen, welcher dieser Gruppen eine Bakterienart angehört.

I. Es ist zu ermitteln ob überhaupt bei einer Zersetzung oder Krankheit Bakterien vorhanden sind oder nicht.

Diese Frage deckt sich im Wesentlichen mit der Frage nach der Generatio spontanea, Abiogenesis, lehrt uns den Werth und die allgemeinen Prinzipien des Sterilisirens kennen und macht uns bekannt mit einer unumgänglich nöthigen Voraussetzung einer einwandsfreien Arbeit über Bakterien.

II. Wenn Bakterien vorhanden sind, ist zu ermitteln, welche Formen dieselben haben.

Diese allgemeine morphologische Frage erfordert, weil die gewöhnliche histologische Technik im Stiche lässt, besondere Kunstgriffe.

III. Jede als anwesend gefundene Form ist rein von allen chemischen und morphologischen Beimengungen für sich zu kultiviren: Reinkulturen.

Die mit Hülfe der Reinkulturen zu lösende Aufgabe ist eine zweifache, indem mit Hülfe derselben die allgemeine morphologische Orientirung ergänzt und erweitert wird und

IV. durch Uebertragung von wirklichen Reinkulturen auf zersetzungsfähige Substrate oder em-

pfängliche Thiere nachzuweisen ist, dass die gefundenen Bakterien die Ursache einer Zersetzung oder Krankheit sind.

Ist durch diese Ermittelungen sichergestellt, welcher der geschilderten Gruppen eine Bakterienart angehört, dann sind, gleichfalls ausgehend von Reinkulturen, noch

V. eine Reihe weiterer, später präcisirter biologischer Aufgaben zu lösen, welche in Verbindung mit den ersten Fragen die breite Basis für die theoretischen Betrachtungen und das praktische Handeln liefern.

Die Lösung aller dieser Fragen ist anzustreben. Aber die bis jetzt gewonnenen Erfahrungen haben schon gelehrt, dass dies nicht in allen Fällen möglich sein wird, dass Fälle eintreten können, in welchen die eine oder andere dieser Cardinalfragen ungelöst bleibt. Bei parasitischen Bakterien, welche den höchsten Grad der parasitischen Adaption, den streng obligaten Parasitismus vertreten, wird es vielleicht nur gelingen, den Nachweis der Anwesenheit von Mikroorganismen zu bringen, während sowohl Reinkulturen als Uebertragungen misslingen. Bei anderen Arten dieser Gruppe ist schon ein weiterer Schritt gelungen, indem man Uebertragungen auf Thiere in beschränktem Maasse ausführen konnte. Bei einzelnen pathogenetischen Bakterien der anderen Gruppen sind wieder umgekehrt Uebertragungen nicht geglückt, weil sich bis jetzt keine Thierspecies empfänglich für bestimmte Krankheiten zeigte, dagegen gelangen Reinkulturen; vergl. Infections-Methoden.

In derartigen Fällen ist den lösbaren Fragen um so grössere Aufmerksamkeit zu schenken und immer daran zu denken, dass es bei voller Beherrschung der Methoden auch in scheinbar aussichtslosen Fällen doch bisweilen gelungen ist, auch hier allmählich noch alle Fragen mustergiltig zu lösen.

Die durch immer subtilere Technik gewonnenen Thatsachen müssen in jeder naturwissenschaftlichen Disciplin das solide Fundament bilden, auf dem sich erst die Theorien aufbauen. Kein Forscher kann, im Besitze auch noch so vieler Thatsachen, der leitenden Ideen entbehren; aber die Abneigung vieler Forscher gegen jede

Speculation wird geradezu erzwungen durch die Art wie von Manchen naturphilosophische Deductionen als Naturwissenschaft ausgegeben werden. Gerade die Bakterienlehre hat in dieser Hinsicht zu traurige Erfahrungen gemacht, als dass wir je vergessen sollten, dass die naturphilosophischen Betrachtungen nichts Anderes sein können, als provisorische Erklärungen noch nicht wirklich erkannter Erscheinungen, deren wirklicher Werth aber in erster Linie in der Anregung zur Forschung liegt. Mit Entschiedenheit haben wir uns dagegen zu wahren, dass derartigen, oft recht wüsten Deductionen zuliebe den Thatsachen Zwang angethan wird, dass das solide Fundament der Thatsachen durch billige Witzeleien über das Streben von „Schablonengelehrten" nach „Thatsächelchen" in Misscredit gebracht wird, oder dass gar, wie es auf dem Gebiete der Bakterienlehre mehr als einmal geschehen ist, Theorien zuliebe widerlegte Angaben immer von Neuem als Beweismaterial citirt werden. Mit Entschiedenheit haben wir es zurückzuweisen, dass Speculationen vom grünen Tische dem praktischen Handeln der Hygiene zu Grunde gelegt werden.

Gegen solche traurige Verirrungen der Speculation giebt es kein besseres Mittel, als die eingehende Vertrautheit mit den immer subtiler sich entwickelnden Methoden, welche auf nur wenig Gebieten so eng mit den wirklichen Fortschritten in Wissen und Können verknüpft sind, als gerade auf dem der Lehre von Mikroorganismen als Ursache von Zersetzungen und Krankheiten.

# I. Generatio spontanea und die Principien der Sterilisation.[1])

Die Reihe der wissenschaftlichen Versuche über diese Frage eröffnete Spallanzani.[2]) Er füllte Infuse organischer Substanzen in Flaschen, welche verkorkt und versiegelt und dann eine Stunde im Wasserbade gekocht wurden. Diese Versuche, die Grundlage der Appert'schen Conservirungsmethode, macht man jetzt besser in Kolben, deren Hals ausgezogen und während des Kochens zugeschmolzen wird. Hin und wieder misslang wohl ein derartiger Versuch bei nur einstündiger Dauer des Kochens, aber der Haupteinwand blieb der, dass kein Sauerstoff zutreten konnte. Gay-Lussac hatte 1810 die Ansicht entwickelt, dass zur Einleitung der Gährungen Sauerstoffzutritt erforderlich sei.

Der nächste methodische Fortschritt bestand darin der Luft nach dem Kochen Zutritt zu verschaffen, aber einer Luft, welche so behandelt war, dass sie keine Keime enthalten konnte. Franz Schulze[3]) wandte einen Kolben an, welcher einen doppelt durchbohrten Kork trug, in dem zwei rechtwinklig gebogene Glasröhren sich befanden, die dicht unterhalb des Korkes endigten. Die fäulnissfähigen Infuse oder in Wasser suspendirten Substanzen wurden so lange auf dem Sandbade erwärmt, bis alle Theile die Temperatur des siedenden Wassers erreicht hatten. Dann wurde, während des

---

[1]) Zusammenfassende Darstellungen der Frage über Abiogenesis, Generatio spontanea finden sich bei Gscheidlen, Physiologische Methodik Heft 2, 1876 S. 274; Heft 4, 1879 S. 499, und bei Tyndall, Essays on the Floating-Matter of the air. second edition 1883.

[2]) Physikalische und mathematische Abhandlungen 1769.

[3]) Vorläufige Mittheilung der Resultate einer experimentellen Beobachtung über Generatio aequivoca. Poggendorf's Annalen der Physik 1836, Bd. 39, S. 487.

Entweichens des Wasserdampfs, an jede der rechtwinkligen Glasröhren ein Liebig'scher Kugelapparat befestigt, von denen der eine mit concentrirter Schwefelsäure, der andere mit Kalilauge gefüllt war. Es wurde nun wiederholt durch Saugen an der Seite des Kaliapparates Luft durch den Kolben gesogen, welche aber vor Eintritt in den Kolben die Schwefelsäure passiren musste. Nun trat trotz Anwesenheit der Luft keine Fäulniss mehr ein, wohl aber in wenigen Tagen, wenn nach dem Kochen gewöhnliche Luft zutrat.

Schwann[1]) zeigte, dass es „nicht der Sauerstoff, wenigstens nicht allein der Sauerstoff der atmosphärischen Luft" sein kann, welcher Gährung und Fäulniss veranlasst, indem er die zutretende Luft durch eine leicht flüssige Metallmischung leitete, welche auf den Siedepunkt des Quecksilbers erwärmt war.

Um dem Einwande zu begegnen, dass hierbei die Luft chemisch alterirt sein könnte, liessen Schröder und von Dusch[2]) die Luft durch Baumwolle streichen, welche entweder in Röhren eingebracht war, die mit den rechtwinklig gebogenen Glasröhren verbunden wurden, oder sie stopften den Hals des Kolbens während des Kochens mit Baumwolle zu. Pasteur[3]) kochte die Infuse in langhalsigen Flaschen, deren Hals langausgezogen und in verschiedener Weise gekrümmt wurde, aber derart, dass das offene Ende nach unten stand. Nach dem Kochen konnte die Luft unverändert, selbst unfiltrirt zutreten und doch trat keine Fäulniss ein.

In der Milch gelang dagegen Pasteur[4]) das Verhüten der Zersetzungen sicher nur bei Steigerung der Temperatur auf 110—112° bei ca. $1^1/_2$ atm. Druck. Die Unzulänglichkeit des Kochens ermittelte auch Schröder[5]) für einzelne Substanzen, welche er nur durch sehr

[1]) Vorläufige Mittheilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulniss. Poggendorf's Annalen 1837, Bd. 41, S. 184.

[2]) Ueber Filtration der Luft in Beziehung auf Fäulniss und Gährung. Annalen der Chemie und Pharmacie 1854, Bd. 89, S. 232.

[3]) Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère. Annales de Chimie et de Physiques III. Ser. T. 64, 1862, S. 66, und kürzere Angaben Compt. rend. Bd. 48, 1859 S. 337, und ibid. Bd. 50, 1860 S. 849.

[4]) De l'origine des ferments. Compt. rend. 1860, Bd. 50, S. 849.

[5]) Ueber Filtration der Luft in Beziehung auf Gährung, Fäulniss und Crystallisation. Annalen der Chemie und Pharmacie 1861, Bd. 117, S. 273.

anhaltendes Kochen oder Steigerung der Temperatur im Digestor bis ca. 2 Atm. sicher sterilisiren konnte.

Zum Sterilisiren mit hohen Temperaturen dient der Digestor, Dampfkessel für gespannten Dampf.

Die anzuwendende Temperatur schwankt zwischen 110—120°, entsprechend einem Druck von ca. 1—2 Atm. Da der Wärmeausgleich durch heftige Flüssigkeitsströmungen erfolgt, welche durch die Temperaturdifferenzen hervorgerufen werden, so sollte man a priori von diesen Apparaten die besten Leistungen erwarten, da nach den Gesetzen der dynamischen Wärmetheorie mit Steigerung der Temperatur die Zeit des Wärmeausgleichs und damit die Zeit des Sterilisirens abnehmen müsste. Diesen theoretischen Postulaten entsprechen manche Apparate[1]), aber durchaus nicht alle.[2]) Zu dieser Unsicherheit kommt weiter das Bedenken, dass viele Substanzen bei Steigerung der Temperatur über 100° chemisch alterirt werden, so dass die Vortheile des Apparates gegenüber anderen für viele Fälle ganz illusorisch werden. Wer im Besitze eines zuverlässigen, erprobten Dampfkessels ist, wird denselben ruhig gebrauchen können, besonders wenn die zu sterilisirenden Substanzen Temperatursteigerungen über 100° ertragen.

Will man ohne Dampfkessel Temperaturen über 100° anwenden, so bedient man sich der Salz-, Oel- oder Paraffinbäder.

Soll die Siedetemperatur des Wassers Verwendung finden, so werden grössere Kolben direct, kleinere Kölbchen, Reagirgläser im Wasserbade gekocht, in dem aber das Wasser etwas höher stehen soll als der Inhalt der Gläser. Der Wärmeausgleich im Wasserbade vollzieht sich nicht nur der geringeren Temperatur entsprechend langsamer, sondern ist als unzuverlässig praktisch genügend erprobt.

---

[1]) Fitz: Ueber Spaltpilzgährungen. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft Bd. XVII 1884, S. 1188.

[2]) Koch, Gaffky, Löffler: Versuche über die Verwerthbarkeit heisser Wasserdämpfe zu Desinfectionszwecken. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte I. 1881, S. 322.

Wenn auch genügendes langes Kochen[1]) wirklich Sterilisiren gestattet, so verwendet man die Siedetemperatur des Wassers doch besser in Form strömender Dämpfe. Hierzu dient der Dampf-Sterilisirungs-Cylinder von Koch, Gaffky und Löffler (Fig. 1). Derselbe besteht aus einem ca. $^1/_2$ Meter hohen, 20 bis 25 cm im Durchmesser haltenden Cylinder von starkem Weissblech, der zum Schutze gegen Wärmeverluste mit einem Asbestmantel umgeben und mit Boden von Kupferblech versehen ist. Im Inneren befindet sich im unteren Drittel bei R ein Rost; der Raum unter demselben wird zu $^3/_4$ mit Wasser gefüllt, welches durch Unterstellen von mehreren Gasflammen (Drei- oder Fünfbrenner) in's Sieden gebracht wird. Als Verschluss dient ein Helm H aus Weissblech mit Asbestüberzug, der nicht hermetisch schliesst, so dass der Dampf an den undichten Stellen entweichen kann. Im Helme wird ein Thermometer t angebracht.

Fig. 1.

Der Apparat kann auch etwas grössere Dimensionen haben. Bei starker Ueberschreitung dieser Dimensionen sind Salzlösungen erforderlich wenn der Dampf beim Ausströmen 100° haben soll. Dadurch, dass der Dampf nicht ganz frei entweichen kann und eine Abgabe der Wärme nach Aussen durch Strahlung verhütet wird, ist die Temperatur im Inneren von der Oberfläche des Wassers bis zum Helme eine ganz gleichmässige und da der Deckel nicht hermetisch abgeschlossen ist, übersteigt die Temperatur des Dampfes die Siedetemperatur nicht, sondern giebt genau die den Druckverhältnissen entsprechende Siedetemperatur des Wassers, d. h. bei annähernd normalem Barometerstande ca. 100° C.

Die Vortheile des Apparates sind gegenüber den Dampfkesseln: seine Billigkeit und die Unmöglichkeit bei Anwendung von Wasser 100° zu übersteigen, sodass alle Substanzen damit sterilisirt werden

[1]) Hueppe, Ueber einige Vorfragen zur Desinfectionslehre und über die Hitze als Desinfectionsmittel. Deutsche militärärztl. Zeitschr. 1882. No. 3.

können, welche 100° ertragen. Der Ausgleich der Temperatur geht sehr prompt von Statten und zeigt die Schwankungen der Dampfkessel nicht, weil die technische Ausführung der Apparate kaum einfacher sein kann und damit die Abhängigkeit von der technischen Ausführung auf ein Minimum reducirt ist. Dem Wasserbade sind die strömenden Dämpfe durch Sicherheit und relative Kürze der erforderlichen Zeit weit überlegen.

Diese praktischen Vortheile lassen diesen Apparat für alle die Fälle, in denen hohe Temperaturen zum Sterilisiren gewünscht werden, als den brauchbarsten erscheinen, trotzdem theoretisch sich der Aussgleich der etwas niedrigeren Temperatur gemäss langsamer vollziehen müsste als bei gespannten Dämpfen über 100°. Das Anwärmen abgerechnet beträgt die Zeit des Sterilisirens $^1/_2$ bis 2 Stunden, je nach der Grösse der Gegenstände.

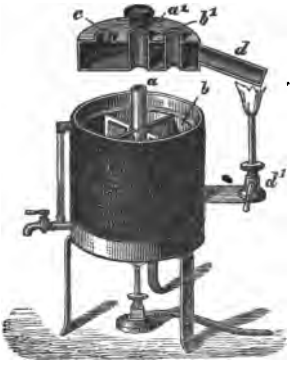
Dem Apparate ist ein Einsatzgefäss beigegeben, in welches die kleinen Kolben, Gläser etc. gestellt werden; an den Henkel des Gefässes oder am Halse grösserer Kolben befestigt man Schnüre zum bequemen Heben und Senken, welche man an die am Rande des Cylinders befindlichen Haken h befestigt.

Durch die bisher betrachteten Temperaturen werden aber manche Substanzen alterirt, besonders immer eine Coagulation der Albuminate herbeigeführt. Um dies zu vermeiden, wendet man die discontinuirliche Sterilisation von Tyndall an. Der Ausgangspunkt dieser „Sterilization by discontinuous Heating“ (l. c. S. 210 u. 337) liegt in der Erfahrung begründet, dass lebende Bakterien unterhalb der Gerinnungstemperatur des Eiweisses bei relativ niedriger Temperatur getödtet werden, während die Dauersporen, der Grund der Anwendung hoher Temperaturgrade[1]), an sich durch diese niedrigeren Temperaturen nicht vernichtet werden, wohl aber wenn sie auskeimen. Lässt man nun Temperaturen zwischen 52 und 65° C. ein bis zwei Stunden auf die zu sterilisirende Flüssigkeit einwirken, so werden sofort nur die lebenden Bakterien, und vielleicht diese nicht einmal sämmtlich, getödtet. In der zusagenden Lösung keimen dann etwaige Dauer-

[1]) Cohn: Untersuchungen über Bakterien IV: Die Bakterien und die Urzeugung. Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. II. Heft 2, S. 249. 1876.

sporen aus, die einen am zweiten, die andern am dritten oder folgenden Tage. Lässt man nun dieselbe Temperatur an einem zweiten oder dritten Tage ebenso einwirken, so vernichtet man jedesmal die lebenden resp. ausgekeimten Bakterien, und wenn man dies genügend lange fortsetzt gelingt es auf diese Weise unterhalb der Zersetzungstemperaturen alle Flüssigkeiten sicher zu sterilisiren. Im Allgemeinen empfiehlt sich eine Temperatur von ca. 58° C. 5 bis 8 Tage hintereinander 1 bis 2 Stunden einwirken zu lassen. Etwas unbequem kann man dies im Wasserbade erreichen, bequemer durch den Apparat Fig. 2. Derselbe besteht aus einem Doppel-Cylinder von Kupferblech, der bis zur halben Höhe ungefähr mit Wasser gefüllt und durch einen Deckel gut verschlossen wird, der gleichfalls mit Wasser gefüllt wird. Der Deckel hat seitlich einen mit dem Hohlraume des Deckels communicirenden Ansatz d, welcher erwärmt wird durch die Flamme $d^1$, während der Cylinder selbst von unten durch eine Gasflamme erwärmt wird. Der Deckel trägt drei Tuben, deren einer c zum Füllen des Deckels und zur Aufnahme eines Thermometers dient, welches die Wärme des Wasser im Deckel anzeigt; ein zweiter Tubus $b^1$ nimmt das Thermometer auf, welches in den Luftraum b des Cylinders führt, und der mittlere Tubus $a^1$ nimmt ein Thermometer auf, welches in eine mit dem Wassermantel communicirende central angebrachte Röhre a geht. Die Füllung des Wassermantels geschieht durch einen seitlich angebrachten Tubus.

Fig. 2.




Das Princip des discontinuirlichen Sterilisirens lässt sich in manchen Fällen auch als discontinuirliches Kochen verwerthen, indem man Substanzen, welche durch langes Kochen alterirt werden, oft bisweilen durch kurzes aber öfters wiederholtes Kochen nicht wesentlich schädigt. Wenn man solche Substanzen, wie z. B. Gelatine 4 bis 5 Tage hintereinander je einmal nur kurz aufkocht, so gelingt es, dieselben sicher zu sterilisiren.

Zum Widerlegen anderer Einwände, welche für die Existenz

der Urzeugung gemacht wurden, kann es wünschenswerth sein Substanzen zu verwenden, auf welche selbst nicht einmal die niedrigen Temperaturen unter der Gerinnungstemperatur des Eiweisses eingewirkt haben. Dies Ziel lässt sich in zwei Weisen erstreben, indem man einmal die Lösungen durch Filtration von etwaigen Beimengungen befreit oder indem man dieselben unzersetzt von Anfang an zu gewinnen versucht.

In erster Hinsicht hatte Helmholtz[1]) beobachtet, dass die Hefewirkung nicht durch Membranen hindurch wirkte, dagegen geschah dies bei der Fäulniss. Derartige Membranen waren also für diese Zwecke nicht brauchbar. Positive Resultate erhielt zuerst Tiegel[2]), indem es ihm gelang, durch Filtration septischer Flüssigkeiten durch Thonzellen unter Anwendung positiven oder negativen Druckes auf einer Seite die septischen Stoffe mechanisch von einer ganz wirkungslosen Flüssigkeit zu trennen. Miquel und Benoist[3]) versuchten die Keime durch Gypsfilter zu entfernen. Sie nahmen Glasballons mit ausgezogenem Halse, in dessen Verengung ein Asbestpfropf und über diesem eine Schicht Gyps sich befand. Vor dem Gebrauche wird der Apparat langsam auf 170° erhitzt, dann wird die zu filtrirende Flüssigkeit langsam auf den Gypspfropf gegeben. Der Pfropf bestand aus 1,6 Asbest, 52,1 Gyps, 46 Wasser. Verdünnte Fleisch- und Pflanzensäfte, Urin filtriren rasch, etwas langsamer Serum und Eiweissflüssigkeiten; alle werden keimfrei, aber auch enzymfrei. Eine unterhalb der Verengerung angeschmolzene Capillare gestattet durch Verbindung mit dem Aspirator in dem Ballon den Druck zu vermindern.

Gautier[4]) bediente sich sehr langhalsiger Flaschen von Fayence oder unglasirtem Porzellan, welche unten in einen Conus

---

[1]) Ueber das Wesen der Fäulniss und Gährung. Müller's Archiv für Anatomie und Physiologie 1843, S. 453.

[2]) Correspondenzblatt für schweizer. Aerzte 1871, S. 275, und Ueber die fiebererregende Eigenschaft des Mikrosporen septicum. Dissert. Bern 1871. Citirt nach Klebs.

[3]) Bulletin de la Société Chimique de Paris 1881. Bd. 35, S. 552.

[4]) Stérilisation à froid des liquides fermentescibles Bulletin de la Société Chimique 1884. Bd. 42, S. 146.

ausliefen. Durch diesen porösen Conus, das eigentliche Filter, soll die zu filtrirende Flüssigkeit von aussen nach innen in die Porzellanflasche eintreten. Zur Erzielung der Luftverdünnung befindet sich in dem Halse der Flasche, durch einen Mennigekitt befestigt, eine rechtwinklig gebogene Glasröhre, deren einer Schenkel bis zum Boden des Conus herabreicht, während das andere äussere Ende conisch verjüngt ausläuft und genau in eine entsprechende conische Erweiterung einer zweiten Glasröhre passt. Diese zweite Glasröhre ist gleichfalls rechtwinklig gebogen und das eine Ende, welches später mit dem rechtwinklig gebogenen Theile der ersten Glasröhre verbunden wird, trägt eine conische Erweiterung, während das andere Ende bis auf den Boden eines Glaskolbens mit engem Halse reicht. Seitlich trägt dieser Glaskolben einen Ansatz mit einer conischen Erweiterung. Die beiden conischen Erweiterungen werden mit Watte geschlossen und dann dieser Glasballon mit Ansatz und mit der Glasröhre für sich sterilisirt. Ebenso wird die Porzellanflasche mit ihrer Glasröhre für sich ausgeglüht und dann unter Entfernung des einen Wattpfropfs der Conus der ersten Glasröhre in die conische Erweiterung der anderen eingefügt. In die conische Erweiterung des seitlichen Ansatzes des Glaskolbens wird unter Entfernung des Wattepfropfs eine entsprechend conisch auslaufende Glasröhre eingefügt, welche mit ausgeglühtem Asbest angefüllt ist. Die Verbindungen beider conischen Erweiterungen mit den entsprechenden conischen Verengerungen werden noch mit Schellack gedichtet. Durch Aspiration am freien Ende der Asbeströhre wird die Luft im ganzen Apparate verdünnt und wenn der Conus der Porzellanflasche in eine Flüssigkeit taucht, durch den entstandenen negativen Druck Flüssigkeit in die Porzellanflasche aspirirt, welche ganz keimfrei ist.

Der mit Terpentinöl bereitete Mennigekitt besteht aus:

| | |
|---|---|
| Krystallisirter Borsäure . . . . | 8 |
| Kieselsäure . . . . . | 2 |
| Mennige . . . . . | 12. |

Die meisten auf diese Weise keimfrei gewordenen Filtrate haben keine tiefgreifenden Alterationen erfahren, aber manche derselben bleiben beim Filtriren nicht unverändert, weil das Filter nicht alle Stoffe gleich gut passiren lässt, so dass eiweissreiche Lösungen oft

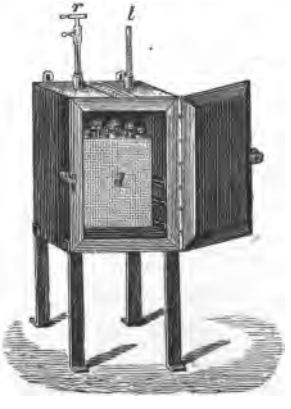
sogar ziemlich stark quantitativ und qualitativ alterirt werden. Um auch diese Zweifel zu zerstreuen, muss man versuchen, die Substrate ganz unzersetzt zu entnehmen durch Anwendung subtilster Reinlichkeit. Man reinigt vor jeder Manipulation die Hände mit 1 p. M. Sublimatlösung, spült die Hände dann mit ausgekochtem Wasser, oder man entfernt das Sublimat durch Alkohol und den Alkohol durch Aether, den man verdunsten lässt. Alle Gefässe werden gut sterilisirt, die Manipulationen werden sehr schnell und etwaige Operationen unter den antiseptischen Cautelen der modernen Chirurgie vorgenommen. Auf diese Weise gelingt es, Blut, Milch, Urin etc. zu gewinnen, ohne dass jemals an desselben etwas gemacht wurde, aber auch ohne dass eine Zersetzung stattfindet. Einige Einzelheiten folgen später bei der Infectionsmethode und den Uebertragungsversuchen. Es erfolgt weder aus unorganisirter Materie, noch aus „Stickstoffsplittern", noch aus Mikrozymen oder durch „Anamorphose des Protoplasma" die Bildung irgend eines Organismus, nicht einmal eines Kokkus, was allerdings viele Autoren nicht abgehalten hat, Molecularbewegung zeigende Körner differenter Herkunft für ächte Kokken anzusprechen, aus denen sich dann später auch Bacillen etc. entwickeln sollten. Wer auf Grund weniger Versuche gegentheilige Resultate zu verzeichnen hat, hat erst nachzuweisen, dass er die Technik so beherrscht, wie dies in den vielen positiven Resultaten von van den Broek, Pasteur, Roberts, Lister, Cheyne, Meissner der Fall war. Die hierzu erforderliche technische Fertigkeit ist aber nur durch viele Einzelversuche zu erreichen.

Durch diese gegen die Generatio spontanea gerichteten Experimente, welche besonders durch Pasteur leicht beherrschbare Form angenommen hatten, und durch die Desinfectionsversuche von Koch wurden auch die noch restirenden Maassnahmen zum Sterilisiren in sichere und bequeme Form gebracht.

Metallgegenstände, Messer, Scheeren, Pincetten, Platinnadeln werden erst mechanisch gereinigt, dann direct in der Flamme geglüht und zum Abkühlen auf eine sterilisirte Glasplatte gelegt, durch Ueberdecken einer Glasglocke gegen Staub geschützt.

Glasgegenstände, Glasplatten, Objectträger, Kölbchen, Reagirgläser werden erst mechanisch gereinigt, dann, wenn sie sehr schmutzig, fettig sind oder schon anderweitig in Gebrauch waren, mit conc. Schwefelsäure oder Salzsäure ab- resp. ausgespült und darauf wiederholt mit Wasser, zuletzt mit destillirtem Wasser bis zum Entfernen jeder Spur sauerer Reaction gespült. Das Wasser entfernt man zunächst durch Ablaufenlassen und die letzten Spuren desselben durch Erwärmen im Trockenschranke oder dadurch, dass man dieselben mit Alkohol aufnimmt; den Alkohol giesst man ab und nimmt die letzten Spuren desselben mit Aether auf, den man verdampfen lässt. Je nach dem Grade der Unreinlichkeit, den die Gefässe zu Anfang hatten, wird man bald in skrupulöser Weise diese ganze Procedur vornehmen müssen, bald sich auf mechanisches Ausspülen mit destillirtem Wasser beschränken können. Die chemisch gereinigten Gefässe, Kolben und Reagirgläser müssen dann noch keimfrei gemacht werden. Zu diesem Zwecke versieht man den Hals der Gläser mit einem sehr fest schliessenden Pfropfe von Watte und bringt die Kölbchen direct auf eine der Platten des mit Thermoregulator r und Thermometer t versehenen, doppelwandigen Trockenschrankes (Fig. 3). Die Reagirgläser stellt man bequemer in Körbe aus Draht (d), welche viele derselben auf nehmen. Katheter, Spritzen, Pipetten, Kapillarröhren und andere Glas-Röhren stellt man in reine Bechergläser und setzt sie mit denselben in denTrockenschrank. Alle derartige Gegenstände bleiben mindestens 2 Stunden bei einer Temperatur von 150 bis 160° C., das Anwärmen nicht mitgerechnet. Man lässt die Gegenstände im Trockenschranke abkühlen, so dass man sie direct demselben zum Gebrauche entnimmt oder bewahrt sie mindestens gegen Staub gut geschützt auf.

Fig. 3.




Korkverschlüsse sind zu vermeiden; Gummipfropfen, Gummikappen, Verbindungsstücke etc. von Gummi werden durch strömende Dämpfe sterilisirt, denen man sie $^3/_4$ bis 1 Stunde aussetzt.

Die meisten Gefässe werden später noch einmal mit dem Inhalte sterilisirt, wobei man zweckmässig, um das Auffallen von Staub auf die Baumwolle zu verhüten, eine Kappe von zwei Lagen Fliesspapier überbindet, da der Watteverschluss wohl bakteriendicht, aber nicht immer pilzdicht ist.

Die bisherigen Erfahrungen haben gelehrt, dass die Keime aus der Luft seltener Ursache der Misserfolge sind, als die unabsichtlichen Infectionen durch unreine resp. ungenügend sterilisirte Gefässe und die Manipulationen mit nicht sicher sterilisirten Händen und Instrumenten.

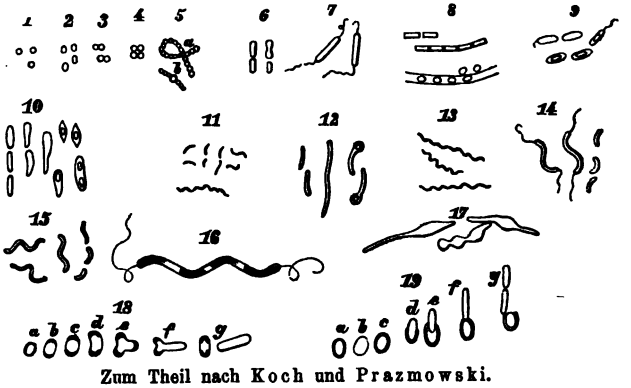
## II. Form der Bakterien und mikroskopische Technik.

Bei Betrachtung bakterienhaltiger Substrate unter dem Mikroskope treten uns verschiedene Formen entgegen, über deren allgemeine morphologische Eigenschaften einerseits, über deren Differenzen oder Zusammengehörigkeit andererseits Aufklärung zu erstreben ist.

Das erstere geschieht durch die allgemeine mikroskopische Technik in ihrer besonderen Anwendung auf die Bakterien, während die zweite Frage erst nach Gewinnung der Reinkulturen gelöst werden kann.

Die Formen der Bakterien, Fig. 4, sind kuglige (1, 3, 4, 5), ellipsoide (2), kürzere (6) oder längere (7) stäbchenförmige Zellen; weiter beobachtet man gekrümmte Stäbchen (11, 12) und schraubenförmige Organismen (13 bis 16). Diese Formen treten bald isolirt, bald in bestimmter Weise (3, 4, 5) verbunden auf. Die nächste Aufgabe ist es nun, diese Formen auseinanderzuhalten, zu trennen, dieselben möglichst natürlich zu gruppiren, um so zunächst eine allgemeine Orientirung über die Gestaltungsverhältnisse der Bakterien zu erhalten.

Fig. 4.



Zum Theil nach Koch und Prazmowski.

I. Aechte endospore Bakterien, Fig. 4. Dieselben pflanzen sich durch Theilung fort und event. auch durch Sporen. Die Sporen werden endogen gebildet.

1. Kokken . . . . . { a. kuglige, b. ellipsoide } Zellen } Neigung zur Bildung von Zoogloea.
2. gerade Stäbchen, Bacillen . . { a. Kurzstäbchen, b. Langstäbchen, c. Clostridiumform }
3. gekrümmte Stäbchen, Vibrionen . . . . . } Neigung zur Bildung von Fäden, Desmobakterien; die Fäden zeigen keinen Gegensatz von Basis u. Spitze.
4. Aechte Schraubenformen, Spirillen und Spirochäten.

II. Arthrospore Bakterien. Diese Formen pflanzen sich gleichfalls durch Theilung fort, aber es bilden sich bei ihnen keine endogenen Sporen. Dagegen können sich einzelne Glieder aus dem Verbande lostrennen und eine neue Generation einleiten. Diese Glieder bilden sich meist endständig als kuglige Zellen, Gonidien oder Arthrosporen.

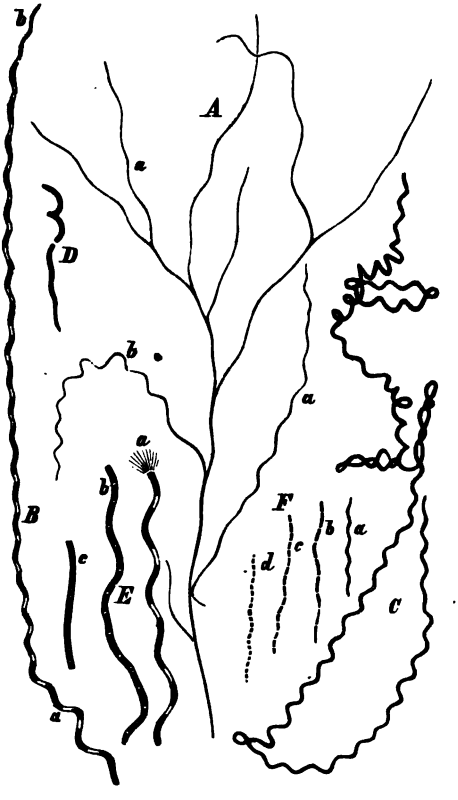
1. Arthro-Koccaceen: besitzen nur Kokken und durch das Aneinanderreihen von Kokken auch Fadenform.
2. Arthro-Bakteriaceen: bilden Kokken ähnliche, kuglige Zellen, aber auch Kurzstäbchen, Langstäbchen und Fäden, welche keinen Gegensatz von Basis und Spitze zeigen.
3. Leptothricheen: bilden Kokken ähnliche Formen, Stäbchen, Schrauben und Fäden, welche einen Gegensatz von Basis und Spitze zeigen.
4. Cladothricheen, Fig. 5: bilden Kokken, Stäbchen, Fäden und Schrauben. Die Fäden bilden Pseudoverzweigungen (A).

Die Arthro-Koccaceen und Arthro-Bacteriaceen sind noch höchst mangelhaft untersucht und sind vielleicht ganz den ächten Bakterien zuzurechnen. Diese zweite Gruppe wurde, so weit sie untersucht war, früher wegen ihrer Formen den Spaltalgen näher gestellt. Zopf rechnete sie direct zu den Bakterien wegen des Auftretens ähnlicher Formen in ihrer Entwicklung und nannte die sonst immer als Gonidien oder Arthrosporen aufgefassten kugligen Theilungs-

produkte ohne Weiteres Kokken.[1]) Der Mangel endogener Sporen trennt diese Gruppe vorläufig mehr von den ächten Bakterien, als das Auftreten ähnlicher Wuchsformen sie denselben nähert.

Nächste Aufgabe der mikroskopischen Untersuchung ist es 1) festzustellen, welche der geschilderten Formen überhaupt vorhanden sind. Nach Gewinnung der Reinkulturen ist 2) zu untersuchen, welche der Formen typisch sind und deshalb namengebend sein müssen; ob die Form unter allen Verhältnissen dieselbe bleibt, so dass die Form nicht nur den Werth als Wuchsform, sondern darüber hinaus auch als Formspecies oder Formgenus haben kann, oder ob die Form sich den Aussenverhältnissen anpasst, indem sie bald grösser, breiter, bald schmäler, kleiner wird, oder ob endlich andere Formen in der Entwicklung auftreten können. Anders ausgedrückt ist zu sehen, ob in der Entwicklung

Fig. 5.




Cladothrix dichotoma; nach Zopf. A Verzweigte Pflanze mit schwächer (a) und stärker (b) gewundenen schraubenförmigen Zweigen. B Schraube, deren eines Ende (a) stärker gewunden ist als das andere (b). C Langer spirochätenartiger Zweig. D Ein Zweigstück mit engen und eins mit ganz flachen Windungen. E Schrauben: a ungegliedert, b mit Andeutung einer Gliederung in Stäbchen und bei c in Zopf'schen Kokken. F Spirochätenform: bei a ungegliedert, bei b schematische Gliederung in Langstäbchen, bei c in Kurzstäbchen, bei d in Kokken.

[1]) cfr. meine Kritik der Arbeit von Zopf in den Fortschritten der Medicin 1883, No. 6, und de Bary's eingehende Begründung der Trennung dieser arthrosporen Formen von denen mit endogener Sporenbildung: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze 1884.

einer Art (Varietät, Rasse)eine einzige Form oder ein Formcyclus auftritt oder auftreten kann.

An Einzelheiten sind mehr, als dies bisher vielfach geschehen ist, folgende Punkte zu beachten. Bei den Schraubenformen, Fig. 4 (13, 14, 15, 16), sind Zahl und Anordnung der typischen Schrauben zu ermitteln, dann ist zu sehen, ob bei der Theilung die Schraube in Vibrio ähnliche gekrümmte Stäbchen zerfällt, ob diese Vibrio ähnlichen Theilungsprodukte sofort wieder zur typischen Schraube auswachsen, oder ob die Theilung noch weiter bis zu stäbchen- und kokkenähnlichen Formen geht und welche dieser event. Formen die neuen Generationen einleiten. Wenn man Reagentien einwirken lässt, muss man das Stadium beachten, da während der Theilung oder unmittelbar vor derselben Reagentien trotz scheinbarer Homogenität schon den Zerfall kenntlich machen können. Auf der andern Seite darf man den Werth solcher chemischer Eingriffe auch nicht überschätzen, da auf der Höhe der Entwickelung das empfindlichste Reagens, die Photographie, keine Spur einer Zusammensetzung zeigt.

Bei den Vibrionen, Fig. 4 (11, 12), deren kleinste Formen (11) Koch wegen ihres charakteristischen Aussehens bei den üblichen Vergrösserungen Kommabacillen nannte, ist zu ermitteln, ob sie sich in kleinere Vibrionen, oder noch weiter in Stäbchen und Kügelchen theilen können. Aus dem Aneinanderlegen von mehreren Vibrionen können ~ förmige und spirillenähnliche Fäden entstehen (11), welche bei ungenügender Beachtung mit ächten Spirillen (13) verwechselt werden können und je nach der Krümmung des einzelnen Vibrio bald stark ausgezogene Schrauben, bald solche mit engen Windungen bilden. Die Spirillen ähnlichen Formen der Vibrionen sind aber nur als eine Art Fadenbildung zu betrachten, welche im Gegensatze zu den artächten Spirillen nur unter bestimmten Bedingungen, z. B. partieller oder totaler Erschöpfung des Nährbodens auftreten und nie die Regelmässigkeit dieser zeigen.

Bei den stäbchenförmigen Bakterien ist zu ermitteln, ob die Theilung Langstäbchen in kürzere Stäbchen, oder gar in ellipsoide und kuglige Zellen überführt. Die Stäbchen können durch Aneinan-

derlegen Fäden bilden, während andere grössere Neigung zur Bildung von Zoogloea zeigen. Cohn hatte deshalb die Vibrionen und Langstäbchen als Fadenbakterien getrennt von den Kurzstäbchen, welche wie die Kokken eine grössere Neigung zur Zoogloeabildung haben sollen. Es ist zu beachten, ob der Nährboden (fest, flüssig) hierauf von Einfluss ist.

Bei den Kokken ist zu ermitteln, ob die ellipsoiden derselben bei der Theilung kleinere Ellipsoide oder Kugeln bilden, ob die kugligen vor der Theilung sich zu Ellipsoiden und ob eventuell die ellipsoiden sich zu kurzen Stäbchen strecken.

Bei gekrümmten Stäbchen kann der Anschein gerader Stäbchen dadurch hervorgerufen werden, dass dieselben mit der Convexität oder Concavität nach oben gerichtet sind. Ein senkrecht stehendes Stäbchen kann den Schein einer Kugel, ein schräg von oben nach unten gerichtetes Langstäbchen den eines Kurzstäbchens erwecken. Ueber solche Fragen ist nur nach vielen Einzelbeobachtungen und unter Anwendung von Reinkulturen zu urtheilen. Viele Hunderte von Beobachtungen in Bakteriengemischen beweisen zur Entscheidung morphologischer Fragen gar nichts.

Eingehende Beachtung verdient die Frage der Sporenbildung, Fig. 4 (5b, 8, 9, 10, 12), und Sporenauskeimung, von der zwei differente Typen (18, 19) als Anhalt dienen können. Vor der Sporenbildung können die Stäbchen zu Fäden auswachsen (8), oder die Sporen können sich in den beweglichen Stäbchen bilden (9); bald bilden sie sich im Inneren (8, 9), bald mehr endständig (12). Oft schwellen die Stäbchen vor der Sporenbildung zu Wetzstein- oder Keulenform an (Clostridium 10). Unter anderen Verhältnissen beobachtet man ganz abnorme, sogenannte Involutionsformen (17). Ueber den Werth der Formen ist grundlegend die Arbeit von Cohn[1]), in welcher er die Beziehungen von Wuchsform, Formgenus, Formspecies, ächten Arten, Formarten, physiologischen Arten zuerst klarlegte. Diese Arbeit ist nicht nur von seinen Gegnern oft ganz

[1]) Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanze, Bd. I., 2. Heft, S. 127. 1872. 2. Abdruck 1881.

falsch verstanden worden, sondern auch im entgegengesetzten Sinne von seinen übereifrigen Anhängern, welche Cohn's Argumente für das Vorkommen ächter Arten unter den Bakterien wiederholt im Sinne einer vordarwinschen Art- und Formconstanz interpretirt haben.[1])

## Nachweis der Bakterien im ungefärbten Zustande.

Die älteste Methode besteht darin, dass man ein Tröpfchen einer bakterienhaltigen Flüssigkeit oder eine Spur des bakterienhaltigen Materials, in einem Tröpfchen indifferenter Flüssigkeit verrieben, auf den Objectträger bringt, das Deckglas darauflegt und nach den Regeln der histologischen Technik beobachtet. Das Bild kommt in diesen Fällen in derselben Weise zu Stande, wie bei ungefärbten Präparaten überhaupt dadurch, dass die Objecte wegen ihres von der Einschlussflüssigkeit abweichenden Lichtbrechungsvermögens nach Koch „durch Diffraction der durchgehenden Lichtstrahlen ein aus Linien und Schatten bestehendes Bild, das Structurbild" liefern. Man beobachtet in diesen Fällen mit Blenden, wie bei anderen histologischen Arbeiten, bei denen man das Structurbild

---

[1]) Zur weiteren Orientirung über diese Fragen:

Naegeli: Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infectionskrankheiten und der Gesundheitspflege 1877;

Naegeli und Buchner: in Naegeli's Untersuchungen über niedere Pilze 1882;

Koch: Zur Aetiologie des Milzbrandes. Mittheilung aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt. Bd. 1. 1881, S. 49.

Gaffky: Experimentell erzeugte Septicaemie mit Rücksicht auf progressive Virulenz und accomodative Züchtung. ibid. S. 80.

Flügge: Fermente und Mikroparasiten 1883 und deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 46.

Zopf: Die Spaltpilze. 2. Aufl. 1884.

de Bary: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze 1884.

Hueppe: Fortschritte der Medicin 1883, No. 6 und 1884, Nr. 6. (Kritik der Ansichten von Zopf) und Ueber die Zersetzungen der Milch und die biologischen Grundlagen der Gährungsphysiologie. Deutsche med. Wochenschrift 1884. No. 48—50.

beobachten will.[1]) Reicht das diffuse Tageslicht nicht aus um den stärkeren Objectivsystemen genügend Licht zuzuführen, so bedient man sich eines Condensors, der nicht das Structurbild auslöschen, sondern das ungenügende Licht verstärken soll. Für diese Art der mikroskopischen Beobachtung dürfte wohl von allen Condensoren der achromatische Condensor der grösseren englischen Instrumente der beste sein.

Die Trockensysteme reichen für die meisten Bakterien nicht aus, um nur annähernd richtig die Form zu erkennen, man muss desshalb schon bei dieser Art der Untersuchung Immersionssysteme anwenden, bei denen nach Amici die Luftschicht durch ein stärker brechendes Medium ersetzt wird, welches den Fehler beim Austritt der Strahlen aus dem Deckglase möglichst corrigirt. Da Deckglas und Frontlinse der Objective aus Crownglas bestehen, so corrigirt Wasser wegen zu geringen Brechungsexponenten den Fehler nicht ganz, so dass bei den Wasserimmersions-Systemen Correctionsfassung und besondere Deckglasdicke erforderlich werden. Die Correction wird aber erreicht, wenn die Immersionsflüssigkeit denselben Brechungsexponenten hat wie Crownglas. Eine solche Flüssigkeit stellt nach Abbé[2]) „eine optisch homogene Verbindung her zwischen dem Präparat und dem Objectiv, welche alle Brechung der Lichtstrahlen vor der ersten kugelförmigen Fläche des optischen Systems aufhebt."

Hierdurch wird der Lichtverlust durch Reflexion an Trennungsflächen optisch verschiedener Medien beseitigt und zugleich „ein sehr erheblicher Betrag von sphärischer Aberration im Entstehen unterdrückt." Ausserdem kann die Correctionsfassung wegfallen, und die Deckglasdicke bedarf keiner so sorgfältigen Controle, „denn so-

---

[1]) Zur weiteren Orientirung über das Mikroskop und die mikroskopische Technik:

Dippel: Das Mikroskop. 2. Aufl. I. 1882/83.

Frey: Das Mikroskop und die mikroskopische Technik 1881, 7. Aufl.

Behrens: Hilfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen 1883.

Strassburger: Das botanische Practicum 1884.

Friedländer: Mikroskopische Technik. 2. Aufl. 1884.

Fol: Lehrbuch der vergl. mikroskop. Anatomie 1884.

[2]) Ueber Stephenson's System der homogenen Immersion. Sitzungsberichte der Jenaischen Gesellschaft f. Med. und Naturw. 1879. 10. Januar.

bald das Zwischenmedium in Refraction und Dispersion dem Deckglase gleichartig ist, wird es für die optische Wirkung gleichgiltig, ob eine dickere Schicht Glas und eine entsprechend dünnere Schicht der Flüssigkeit, oder umgekehrt, zwischen Object und Linsensystem eingeschaltet ist".

In diesem Sinne war von Amici zur Steigerung des Brechungsexponenten Anisöl, von Spencer Glycerin verwendet worden. Neben der Beseitigung der Deckglas-Correction verlangte Stephenson[1]) zugleich zur Steigerung des Unterscheidungs-Vermögens Vergrösserung des Oeffnungswinkels. Diese Verbindung beider Postulate durch Stephenson, ihre Berechnung durch Abbé, ihre Construction durch Zeiss und die Einführung dieser Systeme für homogene Immersion durch Koch[2]) bezeichnen für die mikroskopische Seite der Bakterienforschung einen neuen Aufschwung.[3])

Die beste Flüssigkeit ist das ätherische Cedernholz-Oel, dessen Brechungsindex dem des Crownglases gleich ist, dessen Dispersion diejenige des Crownglases nur in geringem Grade übertrifft. In bestimmter Weise eingedickt bietet es die meisten optischen Vortheile mit bequemer Handhabung. Durch Vermischung anderer stärker brechender ätherischer Oele, Nelken-, Fenchel-, Anis-Oel, mit Oliven- oder Ricinus-Oel, kann man Immersionsflüssigkeiten erhalten, welche der mittleren Lichtbrechung des Cedernöles gleichkommen oder dieselbe in bestimmtem Grade noch übertreffen.

In Folge der Beseitigung der lästigen Deckglascorrection, welche aber den, durch verschiedene Tubuslänge erreichten, Einfluss verschiedenen Bildabstandes auf die Aberration in feiner Weise zu compensiren gestattet, sind die Objective für homogene Im-

[1]) On a large-angled immersion-objective. Journal of the R. Mikroskop. Society. 1878. p. 51.

[2]) Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten, 1878.

[3]) Neben den Systemen für homogene Immersion von Zeiss und zum Theil mit ihnen auf gleicher Höhe stehen, nach meiner Ansicht, bis jetzt nur die Systeme von Seibert und Winkel. Die schwächeren Systeme für den gewöhnlichen Gebrauch werden der Nachfrage entsprechend auch von einigen anderen Firmen schon ganz brauchbar geliefert. Zu warnen ist vor den abnorm billigen Instrumenten, deren geringer Preis nur durch ungenügende Objective erreicht wird.

mersion immer für bestimmte Tubuslänge adjustirt. Es ist deshalb zu beachten, dass Verlängerung des Tubus über diese Normallänge im Sinne der sphärischen Uebercorrection, Verkürzung im Sinne der Untercorrection wirkt.

Bei Benutzung bringt man ein Tröpfchen Oel auf das Deckglas, schraubt mit dem Triebe zur groben Einstellung oder, bei Fehlen desselben durch schraubende Bewegung des Tubus mit der Hand den Tubus soweit herunter, dass die Frontlinse des Objectivs das Oel berührt und das Bild eben anfängt sichtbar zu werden, worauf die feinere Einstellung mit der Mikrometerschraube erfolgt. Andere ziehen es vor das Oeltröpfchen auf die Frontlinse zu bringen, noch Andere bringen je ein entsprechend kleineres Tröpfchen Oel auf Deckglas und Frontlinse. Nach dem Gebrauche wird das Oel mit einem feinen Leinwandläppchen (weniger gut mit Fliesspapier) sorgfältig abgetupft und das System in die Kapsel eingeschlossen. Soll das Deckglaspräparat aufbewahrt werden, so wird das Oel vom Deckglase durch Fliesspapier abgesaugt und der Rest event. durch Chloroform oder Benzin entfernt.

Nach histologischer Tradition, welche durch den früheren Zustand der Instrumente bedingt war, soll man Steigerungen der Vergrösserung mehr durch Steigerung der Systeme als der Oculare erstreben. Nach rein physikalischen Ermittelungen hängt aber die Stärke der Oculare, welche ein Objectiv mit Vortheil verträgt, vom Oeffnungswinkel des letzteren ab. Je grösser der Oeffnungswinkel, desto stärker kann ceteris paribus das Ocular sein. Unsere besten homogenen Systeme entsprechen diesem Postulate derart, dass man dieselben durch Anwendung der stärksten Oculare ausnutzen kann.

Bei dieser Art, Bakterien ohne besondere Präparation zwischen Objectträger und Deckglas zu beobachten, macht sich sofort eine Unsicherheit dadurch bemerkbar, dass fast alle Bakterien in Bewegung sind. Zum Theil scheinen es spontane Bewegungen zu sein, zum Theil einfache Brown'sche Molecularbewegung wie bei allen in Flüssigkeiten suspendirten feinsten Partikeln. Wegen der Kleinheit der Objecte erschweren diese Bewegungen das genaue Beobachten, so dass man schon früh darauf verfiel dieselben aufzuheben und die Gestalt von Mikroorganismen zu fixiren durch „Nar-

cotisiren“ [1]), indem man mit einer Nadelspitze eine Spur Opium, Weingeist oder verdünnter alkoholischer Jodtinctur zum Wassertropfen hinzusetzte.

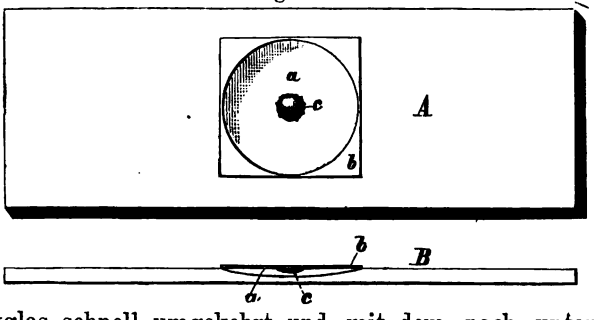
Ein weiteres Mittel, besonders um die kleinsten, kugeligen, mit körnigem Gewebsdetritus leicht zu verwechselnden Bakterien schärfer zu erkennen, ermittelte v. Recklinghausen [2]), indem er die Bakterien ausgezeichnet fand „durch ihr gleichmässiges Korn und durch ihre fast vollständige Unveränderlichkeit in Essigsäure, Glycerin, selbst Natronlauge“.

Baumgarten [3]) konnte Tuberkelbacillen, welche er durch Färbungen nach den damals üblichen Methoden nicht erkannte, durch ihre Resistenz gegen sehr verdünnte Kalilauge sichtbar machen.

Sowohl zum Fixiren als zum Differenziren besitzen wir jetzt bequemere Mittel. Aber es würde ganz unrichtig sein desshalb Bakterien nicht mehr unfixirt und ungefärbt zu untersuchen. Es ist im Gegentheil durchaus nöthig die Bakterien unter möglichst natürlichen Verhältnissen zu beobachten, um über ihre Bewegungen Aufschluss zu bekommen, Sporenbildung und Sporenauskeimung direct zu verfolgen und die Formen nach anderer Behandlung zu controlliren.

Hierzu bedienen wir uns aber nicht der erst geschilderten Art der Untersuchung, sondern der feuchten Kammern. Hierzu kann dienen der hohle Objectträger A, B in Fig. 6; auf ein Deckglas (b) wird ein flaches Tröpfchen (c) der bakterienhaltigen Flüssigkeit gebracht, das Deckglas schnell umgekehrt und mit dem nach unten

Fig. 6.




[1]) Perty, Zur Kenntniss kleinster Lebensformen 1852, S. 13.

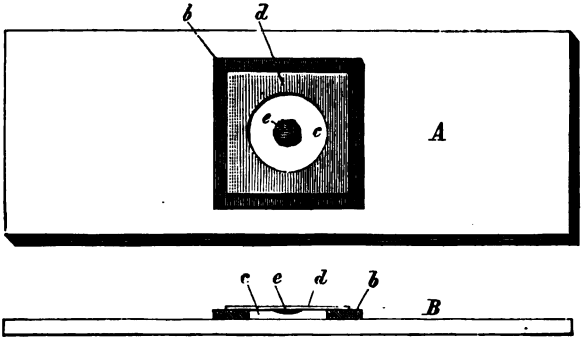
[2]) Verhandlungen der Physikal-Medicin. Gesellschaft in Würzburg. N. F. II. Bd., Heft 4, 1872. Sitzungsbericht S. XII.

[3]) Centralblatt f. d. med. Wissenschaft 1882, No. 15.

hängenden Tropfen (c in Fig. B) über die Höhlung (a) gelegt und durch Vaselin, Wachs, Paraffin oder Balsam umrandet, um den Tropfen gegen Verdunstung zu schützen.

Eine andere, bessere Form stellt Fig. 7 dar. Auf dem Objectträger, A resp. B, ist eine Glasplatte (b) aufgekittet, welche einen kreisförmigen, centralen Ausschnitt (c) hat; durch Auflegen des Deckgläschens d über diesen Ausschnitt entsteht eine Kammer, welche im Gegensatze zu dem fast halbkugeligen Hohlraume von Fig. 6, von parallelen Wänden begrenzt ist. Das Tröpfchen e wird in gleicher Weise befestigt und hängt ebenso in den Hohlraum hinein. Improvisiren kann man sich diese Kammer, indem man statt des aufgekitteten Glases ein Stück entsprechend ausgeschnittene dünne Pappe, angefeuchtet, auf einen gewöhnlichen Objectträger andrückt.

Fig. 7.




Zur directen Beobachtung bei höherer Temperatur dient einer der gebräuchlichen heizbaren Objecttische.

## Färbung der Bakterien.

Die ungefärbten Bakterien werden beobachtet unter Anwendung von Blenden, um das Structurbild deutlich zu erhalten. Sind aber in einem durch sein Structurbild kenntlich gemachten Gewebe oder ähnlichem grösseren Objecte kleine Partikel z. B. von der Grösse von Bakterien eingelagert, so werden diese Partikel durch die Schatten des Structurbildes verdeckt. Sind diese Partikel gefärbt, so werden sie trotz der Schatten bei einer gewissen Grösse in Folge ihrer Färbung noch sichtbar bleiben. Unter einer gewissen Grösse werden sie aber schliesslich trotz der Färbung durch die Schatten des

Structurbildes verdeckt. Es gilt deshalb die Bakterien zu färben und die Beleuchtung so einzurichten, dass das Structurbild nicht mehr stört, sondern das Farbenbild möglichst rein, isolirt, zur Beobachtung kommt.

Diese Isolirung des Farbenbildes erreichte Koch l. c. indem er die Blenden entfernte. Dadurch wurde ein schwaches Structurbild schon so aufgehoben, dass das Farbenbild selbst kleinster Partikel deutlich wurde. Bei stärkeren Structurbildern erreichte er das aber erst als er unter Entfernung der Blenden einen Condensor anwandte, welcher einen so intensiven Lichtkegel auf das Object warf, „dass die Diffractionserscheinungen gänzlich zum Verschwinden gebracht" wurden.

Bei solcher Beleuchtung, bei der „das Präparat in allen Richtungen gleichzeitig von einfallenden Strahlen durchsetzt" wird, „bleiben im Bilde allein diejenigen Elemente sichtbar, die in Folge von Tinction absorbirend wirken". Weiter gewinnt hierdurch noch Abbé die Beobachtung, „obwohl die Beleuchtung dem Namen nach central bleibt, die wesentlichen Vortheile der schiefen Beleuchtung durch die Mitwirkung von Strahlen in grosser Neigung gegen die Axe des Mikroskops."

Wegen dieses Mitwirkens der schiefen Beleuchtung bei isolirtem Farbenbilde und zur vollen Entwickelung des hierzu erforderlichen Unterscheidungsvermögens der Objective für homogene Immersion, welches nach Stephenson durch den grossen Oeffnungswinkel der Objective erreicht wird, muss der Beleuchtungsapparat einen Strahlenkegel von mindestens gleicher Appertur liefern. Dies wird in einer allen Anforderungen entsprechenden Weise bis jetzt nur durch den Abbé'schen Beleuchtungs-Apparat erreicht. Um das Structurbild trotz dieses Condensors benutzen zu können ist eine Vorrichtung zum Einschalten von Blenden angebracht, die man in verschiedener Grösse vorräthig halten muss.

Zur Bakterienforschung gehört neben den Systemen für homogene Immersion ein Abbé'scher Beleuchtungs-Apparat. Hin und wieder kann es selbst nothwendig werden zwischen Beleuchtungs-Apparat und unterer Seite des Objectträgers einen

Tropfen Wasser oder Immersionsflüssigkeit einzuschalten, so dass unten und oben continuirliche Verbindung hergestellt ist. Dies sind dann Immersions-Condensoren, deren man sich schon früher bediente, ehe der Abbé'sche Apparat construirt war.

### *Allgemeine Principien der Färbung.*

Seit Hartig (1854) und Gerlach (1858) durch systematische Anwendung des Carmins in der histologischen Technik gezeigt haben, dass durch Anwendung von Farben bestimmte Bestandtheile von Geweben deutlicher erkannt und von anderen Bestandtheilen differenzirt werden können, betrachtet man die Färbungen als Aequivalent chemischer Reactionen. Weigert[1]) gelang es zuerst Kokken-Zoogloea durch Anwendung von kernfärbendem, ammoniakalischem Carmin und Nachbehandlung mit Salzsäure-Glycerin neben den Kernen zu färben. Die Färbung war zwar zuerst von Weigert als Färbung der Zwischensubstanz aufgefasst worden, was von ihm später berichtigt wurde, aber es war hiermit der Weg gezeigt, die Bakterien nicht nur negativ, durch ihre grössere Resistenz gegen Säuren und Alkalien, zur Anschauung zu bringen. Im folgenden Jahre gelang es Eberth und Wagner Kokken, nicht aber Bacillen, mit Hämatoxylin zu färben. Dann ermittelte Weigert[2]), dass sich Kokken, besonders in Zoogloea, durch verschiedene Kernfärbemittel färben liessen; zu diesem Zwecke benutzte er damals zuerst eine kernfärbende Anilinfarbe, das Methyl-Violett. Durch Nachbehandlung der mit Hämatoxylin gefärbten Präparate, in denen Kokken und Kerne blau gefärbt waren, mit verdünnter Kalilauge und starker Essigsäure gelang Weigert zuerst eine isolirte Färbung der Kokken. Weiter beobachtete Weigert,[3]) dass grössere Bacillen, welche durch Hämatoxylin nicht

[1]) Ueber Bakterien in der Pockenhaut. Centralblatt f. d. med. Wissenschaft 1871, No. 49.

[2]) Sitzung der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Cultur, vom 10. December 1875.

[3]) Berl. klin. Wochenschrift 1877, No. 18/19, und Bericht über die Münchener Naturforscherversammlung 1877, S. 283.

gefärbt wurden, durch gewisse Anilinfarben kenntlich gemacht werden konnten. Bald darauf fand Koch,[1]) dass die Bakterien die Anilinfarben mit einer solchen Sicherheit so schnell und so reichlich aufnehmen, „dass man diese Farben als Reagens zur Unterscheidung der Bakterien von krystallinischen und amorphen Niederschlägen auch von feinsten Fetttröpfchen und anderen kleinsten Körpern benutzen kann.“ Die isolirte Färbung der Bakterien gelang Koch[2]) durch Auswaschen der Schnitte mit kohlensaurem Kali, wobei sich alle Bestandtheile ausser den Bakterien entfärbten. Schliesslich gelang es Weigert[3]) Doppelfärbungen zu erzielen, indem er die mit blauen Anilinfarben behandelten Präparate mit kernfärbendem Pikrocarmin nachbehandelte, wodurch die Bakterien blau und die Kerne roth erschienen, und Koch[4]) gelang es, eine bestimmte Bakterienart anders zu färben als die Kerne und die übrigen gleichzeitig vorhandenen Bakterien.

Welche Farben soll man zur Bakterienfärbung wählen? Weigert's Beobachtung, dass sich die Kokken, nicht aber die Bacillen, in Carmin färben, die ähnliche Beobachtung von Eberth und Wagner über das Hämatoxylin, schienen nach Weigert zuerst durchgreifende chemische Differenzen zwischen den einzelnen Formgruppen von Cohn anzudeuten. Auch Safranin, eines der besten Mittel zum Studium der Kerne, ist für Kokken besser als für die übrigen Bakterien verwerthbar. Weiter ermittelte Obermeyer[5]), dass die Spirillen gegen Säuren und Alkalien weniger resistent sind als die übrigen Bakterien. Aber diese Differenzen sind keine durchgreifenden, da es Kokken und Bacillen gibt, welche Alkalien und Säuren gegenüber weniger resistent sind als andere, da es Bacillen gibt, welche sich mit Hämatoxylin eben so gut oder eben so schlecht färben wie Kokken. Dagegen haben sich sowohl für

---

[1]) Verfahren zur Untersuchung, zum Conserviren und Photographiren der Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II., 3. Heft 1877, S. 399.

[2]) Wundinfectionskrankheiten 1878, S. 39.

[3]) Zur Technik der mikroskopischen Bakterienuntersuchungen. Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 275.

[4]) Berliner klin. Wochenschrift 1882, No. 15.

[5]) Berl. klin. Wochenschrift 1873, S. 391.

das Deckglas-Trockenpräparat als für die Schnitte die basischen Anilinfarben als unter allen Umständen brauchbare Farben erwiesen, so dass wir dieselben in erster Linie zur Bakterienfärbung verwerthen und andere Farben vorwiegend zu secundären Zwecken anwenden.

Ehrlich[1]) unternahm es dann, zum Theil in Verbindung mit seinen Schülern Schwarze und Westphal,[5]) die Farben der mikroskopischen Technik zu klassificiren. Der Ausgangspunkt dieser farben-theoretischen Studien ist die Beobachtung, dass die verschiedenen Bestandtheile der Gewebe und Zellen die Fähigkeit besitzen, bestimmte Farben allein aufzunehmen oder mit grösserer Hartnäckigkeit festzuhalten als andere Gewebselemente. Diese „Election", diese Verwandtschaft der Farben zu gewissen Elementen verleiht den Färbungen den Werth chemischer Reactionen oder, wie es richtiger heissen sollte, zeigt in Ermangelung chemisch präcise definirbarer Reactionen dem Auge das Vorhandensein von sonst nicht oder schwer wahrnehmbaren Differenzen an. Manche Farben färben zunächst viele Bestandtheile eines Gewebes ganz diffus, so dass Einzelheiten nicht genügend zu erkennen sind. Lässt man dann gewisse Extractionsmittel der Farben einwirken, so entziehen diese einzelnen Elementen die Farbe wieder, während andere Elemente trotzdem die Farbe hartnäckig festhalten. In diesen Fällen wird die Möglichkeit „gewisse Elemente ad maximum zu färben, alles Andere aber möglichst ungefärbt zu lassen" erst durch einen Umweg erreicht. Ehrlich nannte diese von Friedländer[2]) bei anderer Gelegenheit zuerst angewandte Methode das „Princip der maximalen Entfärbung".

Histologisch muss man an jedem Farbstoffe zwei Eigenschaften auseinanderhalten: 1. die Election, die Verwandtschaft zu gewissen Elementen und 2. die tinctoriale Kraft.

---

[1]) Zeitschrift für klin. Medicin, Bd. I. 1880, S. 553 und kleinere gelegentliche Mittheilungen.

Schwarze: Ueber eosinophile Zellen. Dissert. Berlin 1880.

Westphal: Ueber Mastzellen. Dissert. Berlin 1880.

[2]) Studien über automatische Herzbewegung; in: Untersuchungen aus dem physiologischen Institut zu Würzburg, I., 1867.

In Bezug auf die Election theilt Ehrlich die Anilinfarben in zwei Gruppen: a) die sauren, b) die basischen Anilinfarben, je nachdem das färbende Princip die Säure oder die Farbbase ist; in diesem histologischen Sinne ist es gleichgültig, ob die Säure als freie Säure oder als Salz und ebenso ob die Base als solche oder als Salz zur Anwendung kommt.

Die sauren Anilinfarben zerfallen in 4 Klassen:

1. Fluorescine, z. B. Fluorescin, Eosin;
2. Nitrokörper, wie Martiusgelb, Pikrinsäure, Aurantia;
3. Sulfosäure, wie Tropaeolin;
4. primäre Farbsäuren: Rosolsäure, Alizarin, Purpurin.

Von den basischen Anilinfarben finden am meisten Anwendung Fuchsin (salzsaures Rosanilin), Methylviolett (salzsaures Trimethylrosanilin), Gentianaviolett, Methylenblau, Vesuvin; seltener Methylgrün, Cyanin, Safranin, Magdala, Dahlia. Von denselben haben besonders die violetten (Methylviolett, Gentianaviolett, Jodviolett, Dahlia) die bisweilen zu Doppelfärbungen verwerthbare Fähigkeit metachromatischer Färbung, d. h. sie tingiren gewisse Elemente in einer von der Grundfarbe abweichenden Farbennuance. Methylviolett z. B. färbt die amyloide Substanz nicht violett wie die Bakterien und Kerne, sondern roth; Methylgrün färbt die Kerne grün, die amyloide Substanz violett.

Die Körper der ersten Geuppe zeigen sämmtlich dieselben electiven Eigenschaften, d. h. sie wirken als Farbsäuren und tingiren alle diesen zugängliche Elemente, aber in verschiedenem Grade. Ebenso zeigen die basischen Anilinfarben dieselben electiven Eigenschaften, indem sie die den basischen Farben zugänglichen Elemente färben; aber auch bei ihnen ist die Intensität der Färbung eine differente. Diese Intensität der Färbung wird bedingt durch die tinctoriale Kraft und diese beruht wesentlich darauf, dass die verschiedenen Farbstoffe der einzelnen Gruppen Extractionsmitteln gegenüber, wie Alkohol, Essigsäure, Glycerin, in verschiedenem Grade von den Gewebs- resp. Zellelementen zurückgehalten werden. So wird z. B. Methylgrün durch Alkohol den Präparaten schon in kurzer Zeit vollständig entzogen, während Vesuvin fast ganz im Präparate bleibt. In Bezug auf diese tinctoriale Kraft lassen sich die basischen Anilin-

farben derart etwa ordnen, dass Vesuvin, Bismarckbraun, Anilinbraun theoretisch die höchste Stufe einnehmen, weil diese Farben selbst durch Glycerin nicht extrahirt werden und sich diese Färbungen gleichzeitig zur Photographie eignen. Darauf folgen in absteigender Linie, aber wegen der den Meisten angenehmeren gesättigten Farben dem Braun meist vorgezogen, Fuchsin, Methylviolett, Gentianaviolett, Methylenblau; die übrigen Farben haben bis jetzt noch keine so universelle Verwendung gefunden. Diese Skala hat jedoch, wie ich zur Vermeidung von Missverständnissen bemerken will, nur eine bedingte Gültigkeit und in bestimmten Lösungsmitteln und zu bestimmter Nachbehandlung zieht man bestimmte Farben vor, wie später noch specieller angegeben wird. Ebenso ist nicht ausgeschlossen, dass sich unter den übrigen Farben vielleicht noch die eine oder andere eine grössere Beliebtheit erringen kann.

Die basischen Anilinfarben sind löslich in Wasser und die meisten in einem oder sämmtlichen Extractionsmitteln. Bei Anwendung chswacher wässriger Lösungen färbt sich zuerst die Intercellularsubstanz und der Zellleib, während die Kerne ungefärbt bleiben. Durch Nachbehandlung mit Alkohol, Glycerin oder Essigsäure tritt eine „Inversion der Färbung" ein, indem die vorher gefärbten Elemente farblos werden, während die vorher farblosen Kerne gefärbt erscheinen. Bei Anwendung stärkerer Lösungen erfolgt die Färbung, ohne Deutlichwerden dieser Inversion, direct und schnell und im Allgemeinen um so intensiver je concentrirter die Lösung ist, und bei ganz concentrirten wässrigen Lösungen kann selbst eine Ueberfärbung eintreten, welche bei Schnittpräparaten durch nachträgliche Extraction auf das richtige Maass zu reduciren ist. Nur Methylenblau überfärbt nach Ehrlich[1])auch nach langer Einwirkung nicht, ist also anzuwenden, wenn aus besonderen Gründen keine Extractionsmittel Anwendung finden sollen. Löst man die Farben in den Extractionsmitteln, absolutem Alkohol, Eisessig, dickem Glycerin auf, so färben sie wenig oder gar nicht.

Statt durch wässrige Lösungen überfärbte Präparate durch nachträgliche Extraction auf das richtige Maass der Färbung zurück-

[1]) Zeitschrift f. klin. Med., Bd. II. 1881, S. 710.

zuführen, kann man für viele Fälle von vornherein zur Lösung der Farbe eine Mischung von Wasser mit Alkohol (Herrmann) oder Glycerin (Schäfer) oder Essigsäure (Ehrlich) anwenden.

### *Herstellung der Farblösungen.*

Die basischen Anilinfarben finden in folgender Weise Anwendung:

1. Concentrirte wässrige Lösungen. Dieselben werden entweder direct benutzt oder in beliebigem Grade mit destillirtem Wasser verdünnt. Die Lösungen werden mit ausgekochtem destillirtem Wasser bereitet derart, dass noch ein Ueberschuss an Farbstoff ungelöst bleibt. Diese Lösungen müssen öfters filtrirt werden. Von diesen wässrigen Lösungen ist kein grösserer Vorrath anzulegen.

2. Concentrirte alkoholische Lösungen. Die Lösung eines Ueberschusses von Farbstoff erfolgt am besten mit absolutem Alkohol oder in Ermangelung desselben mit dem officinellen 90 %igen Spiritus der Pharmacopoe. Im Allgemeinen kann man ca. 20 bis 25 gr Farbstoff auf 100 gr Spiritus oder Alkohol rechnen. Diese Lösungen werden vorräthig gehalten und dienen nicht direct, sondern in bestimmter Mischung mit destillirtem Wasser zur Färbung. Statt der concentrirten wässrigen Lösungen kann man sie verwenden, wenn man 5 bis 6 Tropfen zu einem kleinen Uhrglase mit destillirtem Wasser gibt; diese Mischung bezeichne ich im Folgenden kurz als verdünnte alkoholische Lösung.

3. Vesuvin, Bismarckbraun, Anilinbraun können nicht in alkoholischen Lösungen verwandt werden. Können sie nicht in wässrigen, jedesmal zu filtrirenden Lösungen angewandt werden, so wird eine concentrirte Lösung in gleichen Theilen Glycerin und Wasser[1]) hergestellt.

---

[1]) Koch: Verfahren zur Untersuchung. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1877, Bd. II., 3. Heft, S. 406.

4. Alkalische Lösungen:

a) schwache von Koch[1]):

1 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylenblau;
200 ccm dest. Wasser,
0,2 ccm einer 10 % igen Kalilauge;

b) starke von Löffler[2]):

30 ccm concentrirte alkolholische Lösung von Methylenblau,
100 ccm Kalilauge 1 : 10000.

5. Anilinwasser nach Ehrlich[3]). Gereinigtes Anilinöl wird in Ueberschuss mit destillirtem Wasser geschüttelt, ca. $^1/_2$ bis 1 Minute (ca. 5 ccm Anilinöl mit 100 ccm Wasser), dann nach etwa 5 Minuten langem Stehen durch ein vorher mit destillirtem Wasser angefeuchtetes Filter filtrirt. Das Filtrat muss wasserklar sein und dient statt Wasser als Menstruum. Da dieses gesättigte Anilinwasser sehr schnell herzustellen ist, bereitet man sich dasselbe am besten jedes Mal frisch. Will man es haltbar machen, so setzt man demselben nach B. Fränkel 5 bis 10 % Alkohol zu oder löst 3 ccm Anilinöl in 7 cm Alkohol und fügt 90 ccm destillirtes Wasser hinzu. Als Farben haben sich für dieses Menstruum am besten bewährt Fuchsin, Methylviolett und Gentianaviolett.

Für die meisten Fälle ist es am bequemsten, wenn man nach Ehrlich dem klaren Anilinwasser „von einer gesättigten alkoholischen Fuchsin- oder Methylviolettlösung so lange hinzufügt, bis eine deutliche Opalescenz der Flüssigkeit eintritt, die die Sättigung mit Farbestoff anzeigt."

Für bestimmte Zwecke empfiehlt sich bei häufiger Anwendung folgende Modification der Ehrlich'schen Lösung nach Weigert-Koch[4]), welche aber nach 10 bis 12 Tagen erneuert werden muss, weil allmählich ihr Färbevermögen abnimmt:

---

[1]) Berl. klin. Wochenschrift 1882, No. 15; Mittheilungen aus dem Gesundheitsamte 1884, Bd. II., S. 5.

[2]) Mittheilungen 1884, Bd. II., S. 439.

[3]) Deutsche med. Wochenschrift 1882, No. 19.

[4]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt, Bd. II. 1884, S. 6.

100 ccm gesättigtes Anilinwasser,
11 ccm concentrirte alkoholische Lösung von Methylviolett oder Fuchsin,
10 ccm absoluter Alkohol.

6. Statt Anilin kann als Menstruum dienen Toluidin, in derselben Weise hergestellt (B. Fränkel[1]), ebenso Terpentin (Prior[2]); ferner 5 % ige wässrige Carbolsäure (Ziehl[3]) oder $^1/_2$ % iges Ammoniak (Weigert[4]). [Liq. ammon. caust. 0,5; aq. dest. 90; Alkohol absol. 10; Gentianaviolett 2.]

Für Doppelfärbungen können noch in Frage kommen kernfärbende Carmine und Hämatoxylin[5]), ersteres für blau oder violett, letzteres für roth gefärbte Bakterien.

Statt eines der gewöhnlichen kernfärbenden Carmine kann man für blau gefärbte Bakterienpräparate Pikrocarmin benutzen, welches die Kerne intensiv, die fibrilläre Substanz des Bindegewebes schwach roth und die protoplasmatischen Substanzen mehr oder wenig gelb färbt, so dass eine dreifache Färbung resultirt.

Hämatoxylin verwendet man am besten in folgender Form:

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin . . . . . | 2,0 |
| Alkohol . . . . . | 100,0 |
| Aq. dest. . . . . | 100,0 |
| Glycerin . . . . . | 100,0 |
| Alaun . . . . . | 2,0 |

Dieses Hämatoxylin färbt Kokken und manche Bacillen und gleichzeitig auch deren Zwischensubstanz, Zoogloea. Die Färbung der Bakterien ist schwächer als die durch blaue oder violette basische Anilinfarben, welche dagegen die Zoogloea nicht färben.

Um dreifache Färbungen zu erhalten, nachdem die Bakterien durch Fuchsin roth gefärbt sind, empfiehlt es sich, nach der blauen Kernfärbung mit Hämatoxylin die protoplasmatischen Substanzen noch

---

[1]) Berl. klin. Wochenschrift 1884, No. 13.
[2]) Berl. klin. Wochenschrift 1883, No. 33.
[3]) Deutsche med. Wochenschrift 1882, S. 451. 1883, S. 12 und 247.
[4]) Deutsche med. Wochenschrift 1883, S. 351.
[5]) cfr. die citirten Handbücher, besonders Friedländer.

nachzufärben mit gesättigter Lösung von Pikrinsäure oder mit Eosin; das rosaroth färbende Eosin kann man der obigen Hämatoxylinlösung gleich in 0,5 %iger Stärke zusetzen. (Bei Pikrinsäure muss zur Erhaltung des gelben Tones Pikrinalkohol und Dammarharz angewendet werden.)

### *Andere Reagentien und Utensilien.*

Von anderen Lösungen kommt öfters in Frage:

a)

| | |
|---|---|
| Jod . . . . . | 1,0 |
| Jodkalium . . . . . | 2,0 |
| Dest. Wasser . . . . . | 300,0 |

b) Bei Anwendung der basischen Anilinfarben ist eine Entfettung selten nöthig. Soll eine Entfettung vorausgehen, so werden die Schnitte erst in absolutem Alkohol entwässert (5 bis 10 Minuten), dann werden die Schnitte in ein Uhrschälchen mit Aether und Chloroform einige Minuten übertragen, darauf wieder in Alkohol und nun nach Aufhellen in Essigsäure zur Auflösung der durch coagulirtes Eiweiss veranlassten Trübung direct untersucht, oder erst in die Farblösung gebracht.

c) Salpetersäure wird gebraucht in der Verdünnung von 1 Volumen officineller Salpetersäure zu 3 bis 4 Volumen Wasser.

d) Zum etwaigen Entkalken dient folgende öfters zu wechselnde Flüssigkeit nach von Ebner:

| | |
|---|---|
| Salzsäure . . . . . | 0,5 |
| Alkohol . . . . . | 100 |
| Ap. dest. . . . . | 20 |
| Chlornatrium . . . . . | 0,5 |

e) Essigsäure dient in $^1/_2$ bis 1 %iger Lösung zur Erzielung der maximalen Entfärbung und zum Aufsuchen ungefärbter Bakterien.

f) Chromsäure findet Verwendung in $^1/_2$ %iger Lösung oder als Müller'sche Lösung:

| | |
|---|---|
| Kali bichrom. . . . . | 2,0 |
| Natron sulf. . . . . | 1,0 |
| Aq. dest. . . . . | 100,0 |

g) Kalium und Natriumhydrat werden verwendet in 1 bis 3%iger Lauge zum Sichtbarmachen ungefärbter Bakterien oder indem man 1 bis 2 Tropfen der sonst in der Histologie viel gebrauchten 33%igen Kali- oder Natronlauge zu einem Uhrschälchen Wasser giebt.

h) Glycerin und Alkohol sind immer in reinstem, völlig säurefreiem Material zu verwenden.

i) Destillirtes Wasser, welches zu bakteriologischen Arbeiten dient, ist immer vorher durch stundenlanges Kochen oder in einem der Sterilisirungsapparate zu sterilisiren, da das gewöhnliche destillirte Wasser immer Bakterien und deren Keime enthält. Alle zur Bakteriologie dienenden Lösungen sind mit sterilisirtem, destillirtem Wasser anzusetzen und alle Lösungen und Reagentien vor ihrer Anwendung auf etwaigen Gehalt an Bakterien zu prüfen.

Zum Aufbewahren der Lösungen dienen Flaschen mit eingeschliffenen Stöpseln und für den Tagesbedarf sehr bequem kleine Glasflaschen, deren eingeschliffener hohler Stöpsel oben mit Gummikappe versehen ist und unten in eine Capilare ausläuft, welche gestattet, beliebig grosse und beliebig viele Tropfen sauber zu entnehmen.

Zum Conserviren von Bakterienpräparaten kann Glycerin nur bei den braunen Farben dienen, weil es die übrigen Anilinfarben mehr oder weniger schnell extrahirt; für die braune Farbe kann man die Klebs'sche Glycerin-Gelatine anwenden.

Von concentrirten Lösungen von essigsaurem Kali (1:2) kann man zum Conserviren gefärbter und ungefärbter Bakterienpräparate oft vortheilhaft Gebrauch machen.

Das universellste hierher gehörige Conservirungsmittel ist der Canadabalsam, den man sich am bequemsten in durch Terpentin flüssigem Zustande in Tuben hält. Zum Verdünnen des Canadabalsam kann nur Terpentin oder Xylol dienen, weil Chloroform die basischen Anilinfarben extrahirt. Aus demselben Grunde hat man sich davor zu hüten den Balsam zu erwärmen.

Zum Aufhellen ist wegen desselben Umstandes das beliebte Nelkenöl nicht zu verwenden, sondern statt desselben Terpentinöl, Cedernholzöl oder Bergamottöl.

An Utensilien bedarf man ausser guten Objectträgern und Deckgläschen Uhrgläser, gewöhnliche und mit plangeschliffenem Boden, Porzellanschälchen.

Crystallisationsschalen verschiedener Grösse, am besten zwei Grössen, von denen die grössere gleichzeitig als Deckel für die kleinere Nummer verwerthet werden kann.

Bechergläser verschiedener Grösse, Kolben, Reagirgläser, Trichter, Spritzflaschen, Maasscylinder, Pipetten.

Eine Platte von schwarzem Glase oder Porzellan als Unterlage für weisse und ungefärbte Objecte; eine Platte von Milchglas oder weissem Porzellan als Unterlage für gefärbte Objecte.

Glasröhren, von denen einige an einem Ende zur Capillare ausgezogen sind.

Glasstäbe: In einige Glasstäbe von 10 bis 15 cm Länge werden an einem Ende unter Erwärmen in der Flamme 3 bis 5 cm lange Stückchen Platindraht verschiedener Stärke eingeschmolzen, indem man das eine glühend gemachte Ende etwa $^1/_2$ bis 1 cm tief in das erwärmte zähflüssige Ende des Glasstabes einstösst. Diesen Platindraht lässt man bald gerade, bald biegt man das freie Ende rechtwinklig oder zu einer Oese. Ferner bedarf man oft einer Tiegelzange und mehrerer Schieberpincetten; an einer derselben biegt man vortheilhaft die Branchen etwas auseinander und armirt sie mit platten Korkplättchen zum Anfassen der Deckgläser. Improvisiren kann mar eine Schieberpincette, indem man über eine gewöhnliche Pincette einen möglichst engen Korkring streift. Von Metallinstrumenten bedarf man noch einiger Präparirnadeln, Scheeren, Messer und breiter Spatel von Messing, Stahl oder Platin, auf denen die Schnitte ausgebreitet werden zum Uebertragen von einer Flüssigkeit in eine andere.

Neue Objectträger und Deckgläser werden mit warmem Wasser gereinigt und mit einem feinen Leinwandlappen getrocknet. Genügt dies nicht, so reicht meist ein nochmaliges Abreiben mit einem in Spiritus getauchten Läppchen aus. Um flache hängende Tropfen herzustellen, ist es oft nöthig, auch die scheinbar saubersten Deckgläschen einige Stunden in absolutem Alkohol liegen zu lassen,

den Rest des Alkohols mit Aether aufzunehmen und diesen durch Verdunsten zu entfernen.

Gebrauchte Objectträger und Deckgläschen werden in concentrirte Salzsäure (oder Salpeter- oder Schwefelsäure) gelegt, und zum Reinigen nach der Entfernung aus der Säure so lange mit Wasser behandelt, bis jede saure Reaction geschwunden ist und dann wie neue weiter behandelt.

## Deckglas-Präparate.

Nachdem schon früher beobachtet war, dass die morphologischen Elemente des Blutes in dünner Schicht angetrocknet sich nicht wesentlich ändern, verwandte Koch[1]) diese mehr zufälligen Beobachtungen zuerst methodisch zur Bakterien-Forschung. Er breitete ein Tröpfchen der bakterienhaltigen Flüssigkeit auf einem Deckglase zu einer ganz dünnen Schicht aus, wodurch die einzelnen Elemente annähernd in eine Ebene gebracht wurden. Diese dünne Schicht wurde dann durch einfaches Trocknen an der Luft fixirt. Um kleine Gestaltveränderungen, welche dabei auftraten, wieder aufzuheben, wurde es nöthig, nachträglich wieder eine Quellung eintreten zu lassen. Blieb die lufttrockne Schicht aber zu lange in dem hierzu benutzten Wasser oder Glycerin, so löste sie sich ganz auf, statt nur etwas aufzuquellen.

Wurde das Deckgläschen mit der lufttrockenen Schicht in absoluten Alkohol oder 0,5 % ige Chromsäure gelegt, so wurde die Schicht unlöslich in Wasser und Glycerin, aber sie quoll nicht mehr genügend auf. Wurde aber die unlöslich gewordene Schicht in essigsaures Kali gebracht, so quoll sie genügend auf ohne sich abzulösen, und alle Formen erschienen so wie im natürlichen Zustande. Ebenso wirkten die Lösungen der Anilinfarben, welche die erwünschte Quellung hervorriefen ohne die Schicht abzulösen und noch ausserdem die Bakterien färbten.

Bei Anwendung dieser Methode auf die Blutuntersuchungen

[1]) Verfahren zur Untersuchung etc. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1877. II. 3. Heft. S. 399.

fand Ehrlich[1]), dass das schnelle Antrocknen eine Coagulation der Zellalbuminate ausschloss und die natürliche Färbbarkeit der Elemente erhalten blieb; nur das Hämoglobin wurde durch die wässerigen und glycerinigen Farblösungen extrahirt. Wurden aber die Präparate eine bis mehrere Stunden einer Temperatur von 115 bis 125° ausgesetzt, so hatten alle Elemente des Blutes ohne wesentliche Alteration, ohne Auftreten von Kunstprodukten, ihr electives Färbevermögen behalten. In Folge dieser Beobachtungen wandte Koch, statt des umständlichen Fixirens durch Alkohol, das Erhitzen auch auf die Bakterienpräparate an[2]), aber nur wenige Minuten.

Ein Tröpfchen der bakterienhaltigen Flüssigkeit wird je nach der Menge der morphologischen Bestandtheile unverdünnt oder unter Zusatz eines Tröpfchens destillirten Wassers mit einem ausgeglühten Skalpell oder Platindraht zu einer flachen Schicht auf dem Deckglase ausgebreitet und ein Ueberschuss von Flüssigkeit event. vom Rande her mit Fliesspapier abgesaugt. Oder man legt auf das Deckgläschen mit dem Tröpfchen ein zweites Deckgläschen, welches durch seinen Druck die Schicht gleichmässig flach ausbreitet. Zieht man dann mit Pincetten beide Deckgläschen von einander, so hat man gleich zwei Präparate. Das Deckgläschen bleibt, gegen Staub geschützt, bis zum völligen Trockensein ruhig stehen oder kann in einem Exsiccator etwas schneller getrocknet werden. Beschleunigen kann man das Antrocknen auch, indem man das mit der Pincette gefasste Deckgläschen, mit der Präparatenseite nach oben, hoch über der Gasflamme, gegen deren directe Wirkung geschützt, hin und her bewegt.

Schon auf die so getrocknete Schicht kann man zum Färben einen Tropfen der Farblösung geben, aber nur für den Fall, dass die Flüssigkeit eiweissfrei war und die Färbung schnell erfolgt, da bei längerer Einwirkung die Schicht allmählich ganz losgelöst wird. War die nur angetrocknete Schicht eiweisshaltig, Blut, Gewebssaft, Sputum, so entstehen bei Zusatz der Farblösung ausserdem Niederschläge.

---

[1]) Zeitschrift f. klin. Med. Bd. I., S. 553.

[2]) Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1881, Bd. I. S. 1.

Es wird deshalb meist nöthig, die lufttrockne Schicht durch Erhitzen sicher zu fixiren. Man kann zu diesem Zwecke die Deckgläschen mit der angetrockneten Schicht in einen Trockenschrank bringen oder auf eine Kupferplatte legen. Ein solches Kupferblech legt man auf einen Dreifuss und erhitzt dasselbe an einem Ende durch eine Gasflamme, so dass die verschiedenen Theile, je nach dem sie näher oder entfernter von der Flamme sind, verschieden hohe Temperaturen annehmen. Für Bakterienpräparate genügen einige Minuten bei 125 bis 130° C. oder 10 bis 20 Minuten bei 110°.

Noch bequemer, und bei einiger Uebung auch eben so sicher ist es nach Koch-Löffler, wenn man das Deckgläschen mit der angetrockneten Schicht nach oben dreimal mässig schnell durch eine Gas- oder Spiritusflamme zieht. Der Grund hierfür liegt nach Koch[1]) in der Beobachtung, dass bei den nicht erhitzten Präparaten die oben geschilderten Missstände sich bemerkbar machen, bei ein- bis zweimaligem Durchziehen die Fixirung, besonders bei starkem Eiweissgehalt, nicht für alle Fälle genügt, während bei dem dreimaligen Durchziehen durch die Flamme die Formen sich nicht wesentlich ändern, ihre Färbbarkeit behalten und die Albuminate so unlöslich geworden sind, dass sich keine Niederschläge mehr bilden; noch öfteres Durchziehen setzt die Färbbarkeit für die Bakterien wieder herab (cfr. Sporen-Färbung). Das Misslingen der Präparate, welches erst nach einiger Uebung aufhört, scheint wesentlich darin begründet, dass die Präparate von Anfängern meist schon erhitzt werden, ehe sie vollständig lufttrocken geworden sind. Waren die Präparate noch etwas wasserhaltig, so tritt Coagulation der Albuminate ein, während bei vollständig wasserfreien Präparaten dies nicht geschieht, sondern das Eiweiss durch das Erhitzen „homogenisirt“ wird.

Das lufttrockene und dreimal durch die Flamme gezogene Präparat wird nun gefärbt. Man legt das Deckgläschen mit der Präparatenseite nach oben auf ein Stück Fliesspapier und bringt mit einem Glasstabe oder der Capillarröhre oder

[1]) Mittheilungen 1884. Bd. II, S. 7.

dem zur Capillare ausgezogenen Glasstöpsel einige Tropfen Farblösung auf das Präparat. Die Farblösung bleibt eine bis zwanzig Minuten darauf, indem man durch Neigen des Deckglases sieht, ob das Präparat schon Farbe angenommen hat. Soll die Farblösung länger einwirken, so bringt man nicht die Farblösung tropfenweise auf das Deckglas, weil sich beim Trocknen am Rande des Farbtropfens ein schwer entfernbarer Farbenring bildet, sondern man gibt eine entsprechend grössere Menge der Farblösung in ein Uhrglas oder Crystallisationsschälchen. Dann fasst man das Deckgläschen, die Präparatenseite nach unten gekehrt, lose zwischen Daumen- und Zeige- oder Mittelfinger, und lässt es flach auf die Oberfläche der Farblösung fallen, so dass es mit der Präparatenseite auf der Farblösung schwimmt. Zur Verhütung der Verdunstung deckt man dann eine Glasplatte oder eine zweite Schale darüber.

Zur Abkürzung der Färbung kann man die Farblösung erwärmt anwenden, indem man das Schälchen mit Farblösung und schwimmendem Deckglase nach Koch im Trockenschrank auf etwa 50 bis 60° erwärmt, oder nach Rindfleisch das Schälchen mit der Zange fasst und über kleiner Flamme bis zum Auftreten von Blasen erwärmt, oder nach B. Fränkel, indem man das Anilinwasser im Reagirglase aufkocht, dann erst in das Schälchen giesst, die Farblösung zufügt und das Deckglaspräparat auf dieser heissen Farblösung zum Schwimmen bringt.

Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes richtet man entweder den Strahl einer Spritzflasche, bei schräg gehaltenem Deckglase etwas oberhalb des Präparates, welches direct vom Wasserstrahl nicht getroffen werden darf; oder man schwenkt das mit der Pincette gefasste Deckglas in einem mit destillirtem Wasser gefüllten Becherglase hin und her; oder man saugt den überschüssigen Farbstoff mit Fliesspapier ab, fügt einige Tropfen Wasser hinzu, saugt von Neuem ab und wiederholt dies bis kein Farbstoff mehr an das Fliesspapier abgegeben wird. Dann wird das Deckglaspräparat in einem Tropfen destillirten Wasser untersucht. Die obere Seite des Deckglases wird durch Absaugen mit Fliesspapier oder Blasen mit einer Capillarröhre von jeder Spur

Wasser befreit, weil sie den Oeltropfen für die homogene Immersion aufnehmen muss.

Sollen die Deckglaspräparate conservirt werden, so wird das Oel mit Fliesspapier (und event. Chloroform) wieder entfernt, das Wasser durch vorsichtiges Erwärmen oder Stehenlassen (geschützt gegen Staub, event. im Exsiccator) entfernt und das getrocknete Präparat direct in Canadabalsam eingelegt.

Es sind bei jeder Bakterienart verschiedene Farben anzuwenden, da einzelne nur die Bakterien, andere gleichzeitig die feinen Gallerthüllen, andere Kapseln mitfärben. Die entstehenden Bilder sind deshalb nicht bei allen Färbemethoden absolut gleich, so dass es eigentlich selbstverständlich sein sollte, bei Vergleichen immer nur identisch behandelte Präparate zu benützen. Diese Momente müssen bei der Wahl der Farblösung leiten. Man hat dementsprechend zu unterscheiden zwischen der Färbung zu einem ganz bestimmten Zwecke, zur Nachprüfung oder Anwendung von Färbemethoden, welche für bestimmte Fälle als beste geschildert oder erwiesen sind, und der orientirenden Färbung zum Nachweise der Anwesenheit von Bakterien überhaupt.

Da in Deckglaspräparaten fast alle Bakterien in wässrigen Lösungen der basischen Anilinfarben tingibel sind, so nimmt man zunächst gesättigte wässrige Lösungen oder die gleichwerthigen verdünnten alkoholischen Lösungen.

Die gesättigten wässrigen Lösungen haben für diese Orientirung den Vorzug, für alle bewährten basischen Anilinfarben anwendbar zu sein, so dass man mit wenigen Präparaten schon verschiedene Farben versuchen kann. Hat man trotz der vermutheten Anwesenheit von Bakterien auf diese Weise keine Bakterien zu Gesicht bekommen, so nimmt man Anilinwasser mit Methylviolett oder Fuchsin, oder die starke alkalische Methylenblaulösung.

In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle gestaltet sich demnach die orientirende Untersuchung auf Anwesenheit von Bakterien:

1. Antrocknen in dünner Schicht;
2. Fixiren, indem das Deckglas dreimal durch die Flamme gezogen wird;

3. Färben durch einige Tropfen concentrirter wässriger oder verdünnter alkoholischer Lösung basischer Anilinfarben;
4. Entfernen des überschüssigen Farbstoffs durch Abspülen oder Absaugen;
5. Untersuchen in einem Tropfen destillirtem Wasser.

Zur isolirten Färbung von Bakterien in Deckglaspräparaten kann man die gefärbten Deckglaspräparate ungefähr 1 Minute in eine zur Hälfte gesättigte Lösung von kohlensaurem Kali legen, oder, wenn sie in Anilinwasser-Gentianaviolett gefärbt waren, die übrigen Elemente nach der Methode von Gram[1]) entfärben. Die gefärbten Deckgläser werden zu diesem Zwecke etwa 1 Minute in die Jod-Jodkaliumlösung (S. 37) gelegt, dann in absoluten Alkohol gebracht, bis das Präparat entfärbt erscheint; der Alkohol wird abgesaugt und das Präparat in Wasser angesehen.

Zu Doppelfärbungen an Deckglaspräparaten kann man die nach der Gram'schen Methode entfärbten Präparate aus dem Alkohol in eine schwach wässrige Vesuvinlösung bringen, dann bleiben die Bakterien blau, oft fast blauschwarz, während die Kerne braun gefärbt werden. Man kann auch die roth (oder blau) gefärbten Präparate einige Minuten in Hämatoxylin (oder Carmin) bringen, doch haben diese Doppelfärbungen bei Deckglaspräparaten viel geringeren Werth als bei Schnittpräparaten.

Nur in einem Falle haben dieselben ein grosses praktisches Interesse gewonnen, zum

### *Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum.*

Man könnte diese Präparate nach dem Gram'schen Verfahren färben, aber es werden dann die Tuberkelbacillen und andere Bakterien blau gefärbt, im Gegensatze zu den braunen Kernen. Zur Differentialdiagnose ist dies aber nicht genügend und man wendete deshalb für diesen Zweck ausschliesslich das von Koch ermittelte Prinzip an, die Tuberkelbacillen in einer anderen Farbe zu färben, als die übrigen Bakterien und die

[1]) Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten. Fortschritte der Medicin II. 1884, No. 6.

Kerne. Koch gelang dies, indem er die Präparate 24 Stunden in der schwachen alkalischen Methylenblau-Lösung (S. 35) liess, und dieselbe dann kurze Zeit in concentrirte wässrige Vesuvin-Lösung brachte; es waren dann die Tuberkelbacillen (und die Leprabacillen) blau, alle anderen Bakterien und die Kerne braun gefärbt. Nachdem dieses wichtige Prinzip gefunden war, lehrte Ehrlich in dem Anilinwasser ein noch besseres Mittel zur Steigerung der Färbungsintensität kennen und ermittelte, dass in mit Anilinwasserfarbe gefärbten Präparaten die Tuberkelbacillen einem Entfärben mit Salpetersäure widerstanden, während alle übrigen Bakterien durch diese Mineralsäure entfärbt wurden. Man darf aber die Präparate nicht so lange in der Säure liegen lassen, bis vollständige Entfärbung eingetreten ist, weil dann auch viele oder alle Tuberkelbacillen entfärbt werden. Man lässt dieselben so lange in der Säure, bis der rothe (Fuchsin) oder blaue (Methylviolett) Ton in Gelbroth (resp. grünlich-blau) übergegangen ist. Bringt man in diesem Stadium die Präparate in Wasser, so tritt wieder rothe resp. blaue Färbung ein; durch Einwirkung der Säure waren die einfach sauren Verbindungen (roth resp. blau) in die dreifach sauren (gelbroth resp. blaugrün) übergeführt; bei Wasserzutritt zerfallen die dreifach sauren Verbindungen wieder und es entsteht wieder der rothe resp. blaue Ton. Man spült deshalb die durch Säure entfärbten Präparate nicht in Wasser, sondern in 50 bis 60 %igem Alkohol ab. Dann färbt man mit verdünnter wässriger Lösung von Methylenblau (resp. Vesuvin) nach. Nach dem Abspülen des Methylenblau resp. Vesuvin werden die Präparate in Wasser untersucht oder nach Entfernen des Wassers in Canadabalsam conservirt. Trotz dieser ganzen Procedur behalten die Tuberkelbacillen ihre rothe (resp. blaue) Farbe und sind so leicht unter den übrigen Bestandtheilen zu erkennen. Ausser diesem differential-diagnostischen Effect der Doppelfärbung hat das Nachfärben in einer andern Farbe den Vortheil der leichteren Einstellung des Präparates. Tafel II, Fig. 8.

Ueber die Entnahme des bacillenhaltigen Materials ist noch zu bemerken, dass käsige Massen mit sterilisirtem Skalpell dünn ausgestrichen werden. Tuberkelknötchen müssen mit dem Skalpell (event. erst zwischen zwei Skalpellen) zerquetscht und dann auf dem

Deckglase ganz flach gedrückt werden. Aus dem Sputum werden die zähen, gelblichen Massen benutzt, aus denselben mit dem Skalpell Partikel entnommen und auf dem Deckglase flach ausgestrichen oder durch Auflegen eines zweiten Deckglases breit gedrückt, so dass man nach Auseinanderziehen beider Deckgläser mit Pincetten zwei Präparate hat.

Das ganze Verfahren ist nach Koch[1]), unter Adoption des von Ehrlich eingeführten Anilinwassers, kurz:

1. Deckglaspräparate getrocknet, nach dem Trocknen dreimal durch die Flamme gezogen.
2. Färben mit der Weigert-Koch'schen Lösung von Methylviolett (oder Fuchsin), 12 Stunden lang.
3. Behandeln in verdünnter Salpetersäure (1 zu 3 bis 4) einige Secunden.
4. Spülen in 60%igem Alkohol durch mehrmaliges Hin- und Herbewegen.
5. Nachfärben in verdünnter Vesuvinlösung (oder Methylenblau) einige Minuten.
6. Abspülen; Untersuchen in Wasser.

Dieses Verfahren ist bis jetzt das beste und dient in allen zweifelhaften Fällen zur Controle.

Zur differential-diagnostischen Entfärbung und Nachfärbung sind bis jetzt versucht worden: 1. andere Anilinfarben (Vesuvin von Koch), 2. Säuren (Salpetersäure von Ehrlich, Salzsäure von Orth, Eisessig von Petri), oder 3. saurer Alkohol (schwach salpetersaurer von Rindfleisch, salzsaurer von Orth). B. Fränkel combinirte diese drei Möglichkeiten, indem er saure alkoholische Lösungen von Methylenblau oder Vesuvin herstellte, a) für blau: 50 Alkohol, 30 Wasser, 20 Salpetersäure, so viel Methylenblau, als sich nach wiederholtem Schütteln löst, zu filtriren; b) für braun: 70 Alkohol, 30 Salpetersäure und so viel Vesuvin, als sich löst, zu filtriren. Unter Verwendung dieser Lösung empfiehlt sich für die ärztlichen Bedürfnisse folgendes Verfahren von Fränkel: Man erhitzt ca. 5 ccm Anilinwasser in einem Reagirglase zum Kochen,

[1]) Mittheilungen Bd. II, S. 10.

giesst dasselbe in ein Uhrglas oder Schälchen und fügt zu diesem heissen Anilinwasser so viel Tropfen einer concentrirten alkoholischen Lösung von Fuchsin oder Methylviolett, bis eine kräftige opalescirende Farbe entsteht. Auf dieser warmen Lösung lässt man das Deckglaspräparat schwimmen, und zwar, trotzdem die meisten Tuberkelbacillen schon in 2 bis 3 Minuten gefärbt sind, der Vorsicht halber 5 bis 10 Minuten. Aus dieser Farblösung kommen die roth resp. blau gefärbten Präparate in blaue resp. braune saure alkoholische Lösung. Das Präparat erscheint nach 1 bis 2 Minuten in der letzteren Farbe gefärbt, wird dann in Wasser oder essigsaurem ($^1/_2$ %) 50 % igen Alkohol abgespült und in Wasser untersucht.

Wer mit Orth die Salzsäure vorzieht, kann sich folgenden Verfahrens nach Kaatzer bedienen: Färben wie vorher, dann Entfärben mit Mischung von 100 ccm 90 % igem Alkohol, 20 ccm Wasser und 20 Tropfen concentrirter Salzsäure; Nachspülen mit 90 % igem Alkohol zum Entfernen der Säure; Nachfärben mit concentrirter wässriger Lösung von Methylenblau oder Vesuvin.

Im Sputum finden sich nach Celli und Guarnieri[1]) bisweilen feinste Fettnadeln, welche sich der Färbung gegenüber fast genau so verhalten wie Tuberkelbacillen, „Pseudobacillen", welche aber bei einiger Aufmerksamkeit wegen der verschiedenen Grösse nicht mit ihnen zu verwechseln sind und durch Aether und Chloroform aufgelöst werden.

Die bis jetzt mitgetheilten Modificationen der auf Koch's Prinzip begründeten Ehrlich'schen Methode sind so zahlreich, ohne aber prinzipiell etwas Neues gebracht zu haben, dass ich wegen derselben auf einige zusammenfassende Darstellungen verweisen muss[2]), und mich begnüge mit Angabe der grundlegenden Methode

[1]) Intorno alla profilassi della tubercolosi. Arch. per le scienze mediche 1883. Vol. VII, S. 233. Sopra talune forme cristalline che potrebbero simulare il bacillo del tubercolo. Accad. dei Lincei Juni 1883.

[2]) Kaatzer: Die Technik der Sputum-Untersuchung auf Tuberkel-Bacillen 1884.

B. Fränkel: Ueber die Färbung des Koch'schen Bacillus. Berl. klin. Wochenschrift 1884, No. 13.

Baumgarten: Beiträge zur Darstellungsmethode der Tuberkel-Bacillen; Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie I, 1884, S. 51.

von Koch, der bis jetzt wissenschaftlich besten nach Ehrlich-Weigert-Koch, und von zwei praktisch brauchbaren Modificationen.

Bei diesen Methoden verhalten sich die Leprabacillen, wie die Tuberkelbacillen, von denen sie morphologisch ausserdem nicht ganz leicht auseinander zu halten sind. Die Differential-Diagnose durch Färbung gründet sich darauf, dass sich die Leprabacillen etwas leichter färben, als die Tuberkelbacillen und in Bezug auf die Leichtigkeit der Aufnahme von Farbstoffen ungefähr zwischen diesen und den meisten übrigen Arten stehen. Nach Baumgarten[1]) lässt man das Deckglas-Trockenpräparat 6 bis 7 Minuten in verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung (5 bis 6 Tropfen concentrirter alkoholischer Lösung in einem Uhrglase destillirten Wassers) schwimmen, entfärbt $^1/_4$ Minute in saurem Alkohol (1 Theil Salpetersäure zu 10 Theilen Alkohol), spült die Säure in destillirtem Wasser ab, färbt in wässrigem Methylenblau nach, spült ab, untersucht in Wasser. Die Leprabacillen erscheinen dann als rothe Stäbchen auf blauem Grunde, während Tuberkelbacillen in dieser Zeit bei dieser Behandlung noch keine Farbe angenommen haben.

Das Verhalten der Tuberkelbacillen, sowohl bei der von Koch gefundenen Färbemethode und ihren verschiedenen Modificationen, als bei der Methode von Baumgarten, diese Bakterien ungefärbt zur Anschauung zu bringen, schien zuerst diese Bacillen qualitativ von allen anderen Bakterien zu trennen. Weitere Studien haben jedoch diese Differenzen nicht als qualitative, sondern wesentlich als quantitative erkennen lassen. Die Tuberkelbacillen färben sich am schwierigsten, aber am dauerhaftesten. Seit Lichtheim[2]) und besonders durch die eingehende Arbeit von Baumgarten l. c., steht es fest, dass die Tuberkelbacillen in Deckglas-Trockenpräparaten sowohl durch verdünnte alkoholische, als durch stärkere wässrige Lösungen von Methylviolett, Gentianaviolett und Fuchsin in etwa 1 Stunde gefärbt werden, bei gleichzeitigem Erwärmen in

[1]) Ueber Untersuchungsmethoden zur Unterscheidung von Lepra- und Tuberkel-Bacillen. ibid. S. 367.

[2]) Zur diagnostischen Verwerthung der Tuberkelbacillen. Fortschritte der Medicin 1883, S. 1.

ungefähr 5 Minuten (bei Schnitten ist die Zeit ca. 12 Stunden, resp. etwa 10 Minuten bei gleichzeitigem Erwärmen). Diese Färbungen widerstehen dem Entfärben durch Säuren gleichfalls einige Zeit, während bei zu langer Einwirkung derselben auch die Tuberkelbacillen entfärbt werden. Die Tuberkelbacillen bleiben nach Behandlung mit Kali carbonicum isolirt gefärbt, ähnlich wie andere Bakterien. Werden die gefärbten Deckglaspräparate zum Entfärben etwa 1 Minute, (die Schnitte 5 Minuten) in Alkohol gelegt, und darauf 5 Minuten (Schnitte 15 bis 20 Minuten) in concentrirte wässrige Lösung von Vesuvin oder Methylenblau gebracht, so erhält man Doppelfärbungen. Es ist demnach weder der Zusatz von Alkali, noch von Anilinwasser absolut nöthig zur Färbung, ebensowenig ist das Verhalten gegen Säuren ein qualitativ differentes gegenüber den andern Bakterien, und zur Herstellung von Doppelfärbungen die Anwendung der Säuren nicht durchaus erforderlich. Ein wirkliches Verständniss für die Farbentheorie, welches erst so nahe zu liegen schien, ist demnach durch dieses quantitativ so abweichende Verhalten der Tuberkelbacillen bis jetzt noch nicht gewonnen. Eine Möglichkeit des besseren Verständnisses wird eröffnet durch folgende Thatsachen. Der Zusatz von Alkali sowohl, als des schwach alkalisch reagirenden Anilins erleichtert die Färbung, ähnlich wirken andere aromatische Körper und Ammoniak. Der Zusatz von Säuren zum Anilinwasser hebt dessen Wirkung nicht auf, so dass wahrscheinlich die begünstigende Wirkung der Carbolsäure auf den aromatischen Körper zurückzuführen ist, und sich in ähnlicher Weise, trotz der sauren Reaction, vollzieht.

Weiter ermittelte Gibbes[1]), dass bei gleichzeitiger Einwirkung zweier Anilinfarben die Bacillen sich anders färben, als die übrigen Elemente, während sie bei anderer Anwendung sich in jeder dieser Farben färben. Zu 2 gr Fuchsin und 1 gr Methylenblau fügt man langsam eine Lösung von 3 ccm Anilinöl in 15 ccm Spiritus, und gibt nach Lösung der Farben 15 ccm Wasser hinzu. Diese Lösung wird erwärmt und das Deckglaspräparat 5 Minuten aufgelegt, dann mit Spiritus abgewaschen, bis keine Farbe mehr heruntergeht; die

[1]) Lancet 1883, S. 771.

Bacillen erscheinen dann roth auf blauem Grunde. Diese kurze Methode ist leider nicht praktisch sicher genug.

***Die Untersuchung des Blutes auf Bakterien***

kann sehr grosse Schwierigkeiten bieten, weil schon im normalen Blute innerhalb der Gefässe und beim normalen Zerfall des gesunden Blutes körnige Elemente vorhanden sind, resp. sich bilden, die unter pathologischen Verhältnissen, bei anämischen Zuständen, bei Fieber vermehrt auftreten, und welche leicht mit Kokken verwechselt werden können, schon sehr oft verwechselt sind und noch fast täglich damit verwechselt werden; z. B. die berühmten Syphiliskörperchen und die angeblichen Organismen des Schlangengiftes; hierher gehört auch Manches, was als Genese von Bakterien aus Stickstoffsplittern, aus Mikrozymen oder durch „Anamorphose des Protoplasma" angesprochen worden ist. Ein genaues Studium dieser Blut-Granulationen ist deshalb bei der Bakterienforschung ein unumgängliches Desiderat. Diese Granulationen bilden aber ferner einen Bestandtheil der zelligen Elemente des Blutes, welche wieder dadurch für die Aetiologie von Interesse sind, dass es Parasiten gibt, welche den amöboiden Zellen ähnlich sind, z. B. die von Lewis im Blute von Ratten, von Koch im Blute von Hamstern gefundenen pathogenetischen Geisselmonaden.

Die direct oder durch ihre Granulationen zu Verwechslung Veranlassung gebenden Elemente des Blutes, mit Ausnahme der rothen Blutkörperchen und ihrer Zerfallsproducte, theilt man nach Ehrlich[1]) ein:

I. Lymphogene Elemente.
   a) kleine Lymphocyten;
   b) grosse Lymphocyten.

II. Myelogene Elemente:
   Eosinophile Zellen.

[1]) cfr. die S. 31 citirten Arbeiten von Ehrlich, Westphal, Schwarze; ferner Spilling: Ueber Blutuntersuchungen bei Leukämie. Dissert. Berlin 1880, und Einhorn: Ueber das Verhalten der Lymphocyten zu den weissen Blutkörperchen. Dissert. Berlin 1884.

III. Unbestimmt (Milz und (oder) Knochenmark):

a) grosse Mononucleäre Zellen;

b) Uebergangsformen;

c) Polynucleäre.

Die kleinen lymphogenen Elemente sind etwas kleiner, als die rothen Blutkörperchen, besitzen einen sehr grossen Kern, so dass von Protoplasma nur sehr wenig oder nichts zu sehen ist. Die grossen lymphogenen Elemente sind eine weitere Entwicklung der ersteren und von ihnen nur dadurch unterschieden, dass sie um den grossen Kern einen deutlichen Protoplasmasaum besitzen. Die myelogenen Elemente sind grosse, rundliche Zellen mit einem grossen länglichen Kerne. Die grossen mononuclcären Zellen sind ungefähr dreimal so gross, wie die rothen Blutkörperchen, und besitzen einen grossen runden oder ovoiden Kern und grossen Protoplasmahof. Die mononucleären Uebergangsformen sind von diesen Zellen nur dadurch unterschieden, dass der Kern nicht mehr rund oder ovoid ist, sondern eine Einbuchtung erlitten hat. Die polynucleären Elemente sind etwas kleiner, aber immer noch grösser wie die rothen Blutkörperchen und ihr Kern zeigt eine weitere Differenzirung, eine polymorphe Gestalt; sie sind die eigentlichen weissen Blutkörperchen.

Die körnigen Elemente oder Granulationen, welche in diesen Zellen vorhanden sind und beim Zerfalle derselben frei werden können, theilt man in Bezug auf ihr Verhalten zu den Anilinfarben ein:

Die $\alpha$-Granulationen oder eosinophile Körnung ist grobkuglig, stark glänzend und in allen sauren Anilinfarben tingibel. Sie findet sich in den myelogenen Elementen, ist im normalen Blute selten, bei leukämischen Prozessen stark vermehrt.

Die $\beta$-Granulationen oder amphophile Körnung findet sich besonders im Knochenmark, im Blute vielfach in Leukocythen bei Kaninchen und Meerschweinchen und ist in sauren und basischen Anilinfarben tingibel.

Die $\gamma$-Granulationen oder basophile Mastzellenkörnung ist, wie die Bakterien, durch basische Anilinfarben tingibel. Die Körner sind grob, wenig lichtbrechend, fehlen im menschlichen Blute normal fast ganz, treten bei leukämischen Prozessen vermehrt auf; im

Blute niederer Thiere, besonders der weissen Ratten, sind sie normal vorhanden.

Die δ-Granulationen oder basophile Körnung ist fein, in basischen Anilinfarben tingibel und findet sich als Bestandtheil der grossen mononucleären Elemente.

Die ε-Granulationen oder neutrophile Körnung ist sehr fein, und erfüllt die polynucleären Elemente des Menschenblutes ganz dicht, kommt in den Uebergangsformen spärlich vor, und sehr selten in den monucleären Elementen; sie sind in neutralen Farben tingibel.

Bei Ausserachtlassung der Färbung können diese Granulationen sämmtlich, und ebenso die Zerfallsproducte der rothen Blutkörperchen, mit Kokken verwechselt werden. Bei systematischer Anwendung der Anilinfarben kann man sofort ausschliessen die α-, β- und ε-Granulationen. Eine Verwechslung ist dann nur noch möglich mit den γ- und δ-Granulationen, weil diese sich, wie die Bakterien, in basischen Anilinfarben färben. Diese letzteren sind durch ihr feines Korn relativ leicht von Kokken zu unterscheiden, und sind bis jetzt, wie es scheint, noch nicht mit Bakterien verwechselt worden. Die Mastzellenkörner dagegen kommen in ihren mittleren Grössen den bekannteren Formen der Kokken so nahe, dass nicht nur die einzelnen freien Granulationen im Blut als Kokken gedeutet worden sind, sondern sogar die sogenannten Matszellen in den Geweben als Colonien von Kokken wiederholt beschrieben wurden. Rein morphologisch sind sie dadurch zu unterscheiden, dass sie das gleichmässige Aussehen der Kokken nicht alle haben, sondern dass sich die verschiedensten Uebergänge zwischen den verschieden grossen Körnern finden.

Will man das Blut auf Bakterien zur Orientirung prüfen, so streicht man ein Tröpfchen flach aus, trocknet die dünne Schicht an, fixirt, indem man dieselbe dreimal durch die Flamme zieht, und färbt wie gewöhnlich. In derartigen Präparaten färben sich die Bakterien genügend, die Granulationen aber noch nicht gut.

Die Entnahme eines höchstens stecknadelkopfgrossen Bluttropfens muss zu diesem Zwecke mit grösster Vorsicht geschehen. Man entnimmt entweder bei Gelegenheit einer Blutung mit einer geglühten und wieder abgekühlten Platinnadel ein Tröpfchen Blut oder durch Einstich in

die Haut, am besten an der Fingerkuppe, mit einer durch vorangegangenes Glühen sterilisirten Nadel. Die Haut wird an dieser Stelle mit Seife und Bürste gereinigt, dann mit 1 p. M. Sublimat gewaschen, das Sublimat mit Alkohol entfernt und der Alkohol mit Aether aufgenommen, den man verdunsten lässt. Der erste hervorquellende Blutstropfen wird mit geglühter Platinnadel weggenommen und erst die folgenden Tropfen benutzt. Auf ein hervorquellendes Bluttröpfchen wird ein mit einer Pincette gefasstes Deckglas leicht aufgetupft, aber ohne jede Berührung mit der umgebenden Haut. Auf dieses mit der Pincette gehaltene und mit dem Blutstropfen versehene Deckglas wird mit einer Pincette ein zweites Deckglas gelegt, welches durch seinen Druck das Bluttröpfchen zu einer ganz flachen Schicht ausbreitet, in der die Elemente sich nicht wesentlich alterirt zeigen. Die beiden mit Pincetten gefassten Deckgläschen werden von einander abgezogen, so dass man gleich zwei Deckgläser mit den gewünschten dünnen Schichten Blut erhält. Die Deckgläschen werden, nachdem die Schicht lufttrocken geworden ist, zum Theil wie oben angegeben, nur nach kurzem Erhitzen auf Bakterien geprüft, zum Theil aber eine Stunde einer Temperatur von 120° ausgesetzt und dann mit basischen Anilinfarben behandelt, um die basophilen Granulationen genauer zu studiren.

Andere Präparate behandelt man zur Darstellung der eosinophilen Elemente mit sauren Anilinfarben nach kurzem und nach einstündigem Erhitzen. Man stellt eine Mischung eines gelben, schwarzen und rothen Farbstoffs von höchster tinctorialer Kraft her, deren jeder für sich allein alle säurebildenden Elemente färbt, bei deren gleichzeitiger Einwirkung aber wieder die Election sich derart geltend machen, dass man drei verschiedene eosinophile Elemente gleichzeitig in verschiedener Farbe färbt. Ein Volumnen eines mit Aurantia gesättigten Glycerin wird mit zwei Volumen Glycerin versetzt, dann Anilinschwarz (Indulinsulfosäure) und Eosin in Ueberschuss zugesetzt und durch langes Schütteln gesättigt. Diese gesättigte, glycerinige Lösung färbt alle hämoglobinhaltigen Parthien intensiv orange, die Kerne grauschwarz bis schwarz, die eosinophile Körnung roth bis rothschwarz.

Zur Darstellung der neutrophilen Körnung dienen neutrale

Farben, welche durch Zusammentreffen von Farbbasen mit Farbsäuren entstehen, z. B. wenn Säurefuchsin (rosanilinsulfosaures Natron) und Orange (G) mit dem basischen Methylgrün gemischt werden. Man mengt nach Ehrlich 125 ccm einer gesättigten wässrigen Orangelösung mit 125 ccm einer in 20%igem Alkohol gesättigten Lösung von Säurefuchsin, fügt 75 ccm absoluten Alkohol hinzu und dann allmählich unter Schütteln 125 ccm gesättigte wässrige Lösung von Methylgrün. Die Lösung bleibt einige Zeit stehen, es bildet sich dann sowohl ein Niederschlag, als ein Häutchen an der Oberfläche. Man führt, um die Lösung ganz klar zu erhalten, eine Pipette in die Mitte der Lösung, entnimmt hier beliebige niederschlagsfreie Mengen; Pipette sowohl als Gefässe müssen absolut trocken sein, weil sonst sofort wieder Trübungen auftreten. In dieser Mischung färbt sich das Hämoglobin gelb bis orange, die Kerne grünlich, die neutrophile Körnung violett, die eosinophile dunkelgrau mit einem Stich in's Blaue.

Zur Darstellung der Zellen des Blutes dient folgende Mischung:[1]) 100 ccm Wasser, 100 ccm Glycerin, 100 ccm absoluter Alkohol, Hämatoxylin 1 bis 2 gr, Alaun bis zur Sättigung, Eosin 1 gr, Eisessig 10 ccm; die rothen Blutkörperchen zeigen eine intensiv rothe Farbe, die Kerne der Lymphocyten und Polynucleären sind intensiv blau, die Kerne der Mononucleären bläulichgrau gefärbt. Das Protoplasma der grossen Lymphocyten und der Polynucleären ist röthlich, das der Mononucleären dunkelgrau.

Die Wichtigkeit dieser Untersuchungsmethoden für den Nachweis von Mikroorganismen im Blute ist von Koch[2]) schon längst dargelegt worden, hat aber die nöthige Beachtung noch nicht überall gefunden. Die hier gegebene Darstellung war deshalb durchaus erforderlich und um so nöthiger, als in Folge der schweren Zugänglichkeit der Original-Arbeiten selbst unsere guten Handbücher der histologischen Technik hierüber ungenügend berichten.

Die Färbung der Geisseln, Fig. 4 (7, 9, 14, 16), welche sich im hängenden Tropfen in der feuchten Kammer durch einen

---

[1]) Ehrlich: Deutsche med. Wochenschrift 1883, No. 46.

[2]) Mittheilungen Bd. 1, 1881, S. 7.

Strudel an einem oder beiden Polen der Bakterien bemerkbar machen, gelingt an Deckglas-Trockenpräparaten nach Koch[1]) am besten durch Zusatz von concentrirten wässrigen Lösungen von Extr. campech. Die Geisseln werden braun gefärbt, doch ist die Färbung in dieser Weise nicht haltbar. Man legt deshalb die gefärbten Präparate einige Zeit in 0,5%ige Chromsäure oder in Müller'sche Lösung, es bildet sich dann eine unlösliche braunschwarze Verbindung des Extr. campech. mit der Chromsäure. Nach dem Abspülen können diese Präparate direct in Glycerin, oder nach vorausgegangenem Trocknen in Canadabalsam conservirt werden.

### Färbung der Sporen. Taf. II. Fig. 9.

Beobachtet und gezeichnet, aber nicht richtig erkannt, wurden Sporen von Bakterien zuerst wohl von Perty.[2]) Pasteur[3]) machte dann einen scharfen Unterschied zwischen der Biologie der Organismen und ihrer Keime, ohne aber die Frage morphologisch ganz zu lösen. Der erste, welcher die Bildung und Auskeimung der Sporen biologisch und morphologisch erkannte, war Cohn.[4]) Weitere Einzelheiten brachten Koch, Brefeld, Buchner und besonders Prazmowski[5]), welcher verschiedene Arten der Sporenauskeimung, Fig. 4 (18 und 19) sicher stellte, wodurch dieser Fructificationsvorgang eine erhöhte Bedeutung gewinnt.

Die Beobachtung der Sporen erfolgte bis vor Kurzem ausschliesslich im ungefärbten Zustande, Fig. 4 (5b, 8, 9, 10, 12). Sie erscheinen besonders schön im hängenden Tropfen und bei Abblendung als starkglänzende rundliche oder ovale Körperchen in den weniger glänzenden Bakterien oder frei neben denselben. Bald liegen

---

[1]) Verfahren zur Untersuchung etc. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1877, Bd. II. 3. Heft, S. 419.

[2]) Zur Kenntniss kleinster Lebensformen 1852, Taf. XV, Fig. 26 und folgende.

[3]) Études sur la maladie des vers à soie, 1870, I, S. 228.

[4]) Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1876, II. Bd., 2. Heft, S. 263.

[5]) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten 1880 und Ueber den genetischen Zusammenhang der Milzbrand- und Heubakterien. Biolog. Centralblatt 1884, No. 13.

sie mehr nach der Mitte zu, bald ganz am Ende; die Zellen, in denen sie sich bilden, sind bald unverändert, bald eigenthümlich aufgetrieben. Da contrahirtes Bakterienprotoplasma nach Prazmowski gleichfalls stärker lichtbrechend ist, so ist das Gesammtverhalten in Betracht zu ziehen, um ein stärker lichtbrechendes Körperchen als Spore zu erklären.

Hierher gehört einmal das obige, regelmässig unter bestimmten biologischen Umständen eintretende morphologische Verhalten, die grosse Resistenz gegen chemische Eingriffe und besonders gegen hohe Temperaturen und die Beobachtung, dass sich bei der Anwendung wässriger oder verdünnter alkoholischer Lösungen die Sporen nicht färben und als ungefärbte glänzende Lücken in den gefärbten Bakterien erscheinen.

Eine zufällige Beobachtung lehrte aber, die Sporen auch gefärbt zur Anschauung zu bringen. Koch[1]) sah, dass sich bei Färbung der Tuberkelbacillen mit Anilinwasser-Methylenblau die Sporen einer grossen Bacillenart gleichfalls blau färbten, während sich die Bacillen selbst bei der Nachbehandlung braun färbten. Die Sporen anderer Bacillen vermochte Gaffky nicht in dieser Weise zu färben. Dagegen gelang es Neisser, die Sporen roth, die Bacillen blau zu färben, wenn er Anilinwasser-Fuchsin warm anwandte und mit Methylenblau nachfärbte, und Bienstock[2]) machte von dieser Färbung Gebrauch. Weiter ermittelte Buchner[3]) ein Verfahren zur isolirten Färbung der Sporen. Weil die Färbung der lebenden Bakterien nicht gelingt, wohl aber der durch Trocknen und Erhitzen getödteten, glaubte Buchner den Grund der Nichtfärbung der Sporen in der grösseren Resistenz der Sporenmembran suchen zu müssen. Er suchte deshalb die Sporenmembran von bac. subtilis zu tödten und dadurch für Farben zugänglich zu machen, und erreichte dies indem er die Deckglas-Trockenpräparate $^1/_2$ bis 1 Stunde auf 210° im Trockenschrank erhitzte oder 1 Stunde bei 120° im Dampfkessel hielt, oder indem er das Präparat mit concentrirter englischer Schwefelsäure

[1]) Mittheilungen 1884, Bd. II, Tafel V, Fig. 23.

[2]) Zeitschrift für klin. Med. 1884, S. 1.

[3]) Ueber das Verhalten der Spaltpilz-Sporen zu den Anilinfarben. Aerztliches Intelligenzblatt 1884, No. 33, S. 370.

betupfte und nach 15 Secunden sorgfältig auswusch, oder endlich, indem er concentrirte Kalilauge längere Zeit einwirken liess. In den so behandelten Präparaten färbten sich. besonders durch Methylenblau, die Sporen allein, während die Bakterien selbst keine Farbe mehr annahmen.

Noch vor Bekanntwerden der kurzen Mittheilung von Buchner hatte ich versucht, die Sporen in Doppelfärbungen und isolirter Färbung zur Anschauung zu bringen. Wenn auch die Untersuchungen noch nicht nach allen Richtungen abgeschlossen sind, so theile ich doch die allgemeinen Resultate hier mit, weil dieser Theil der Färbetechnik noch wenig bekannt und geübt ist.

Untersucht man kurz vor der Sporenbildung im hängenden Tropfen, so findet man in vielen Bakterien schon glänzende Körperchen, welche aber nicht die Gleichmässigkeit der Sporen haben. Färbt man die getrockneten und durch dreimaliges Durchziehen durch die Flamme fixirten Präparate mit wässrigen oder verdünnten alkoholischen Farblösungen, so findet man in diesem Stadium die Bakterien nicht so gleichmässig gefärbt wie sonst, sondern einzelne Parthien stärker gefärbt. Dieses contrahirte Protoplasma färbt sich besser, als das nicht verdichte Bakterien-Protoplasma. Andeutungen hierüber hatte ich schon früher bei den Involutionsformen des bac. cyanogenus gesehen. Dann folgt ein Stadium, in dem die glänzenden Körperchen schon viel gleichmässiger sind, aber sich noch sehr gut färben, und dann folgt ein Stadium, in welchem sich ebensolche glänzende Körperchen in den ungefärbten Präparaten finden, welche aber keine Farbe mehr annehmen. Erst jetzt ist die Spore fertig durch Bildung einer schwer durchgängigen Membran, welche die Aufnahme des Farbstoffs verhindert.

Zieht man das lufttrockne Deckglaspräparat dreimal durch die Flamme, so färben sich in diesen Präparaten Bakterien und Kerne gleich gut, zieht man öfter, bis zu etwa 6 Mal durch die Flamme, so färben sich successive die Bakterien immer schlechter, die Kerne noch immer gut, aber auch das contrahirte, aber noch nicht zur ächten Spore gewordene Protoplasma der Bakterien färbt sich noch. Man kann dann neben den Kernen oft körnige Elemente sehen, über deren Zugehörigkeit zu den schlecht gefärbten Bakterien man leicht

sich täuschen kann. Zieht man noch öfter, bis zu 10 Mal, durch die Flamme, so verlieren auch die Kerne und das contrahirte Protoplasma die Fähigkeit, Farben aufzunehmen, dagegen gewinnen diese Fähigkeit die Sporen.

Bei einzelnen Fäulnissbacillen genügt schon 7maliges Durchziehen, bei andern erst 10maliges (im Trockenschrank war das gleiche Stadium bei ca. 180° resp. 200° in etwa $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde erreicht). Die Sporen nehmen dann wässrige Lösungen von rothen, violetten, blauen, braunen und grünen basischen Anilinfarben an. Diese isolirten Färbungen sind zur Prüfung der Resistenz der Sporen, wie Buchner meinte, vielleicht mit zu benutzen. Da man hierbei aber über das Verhalten der Sporen zu den Bakterien nichts erfährt, ist es besser, Doppelfärbungen anzuwenden. Das Verfahren ist fast dasselbe, quantitativ gesteigerte, wie bei den Tuberkelbacillen. Man färbt entweder die dreimal durch die Flamme gezogenen Präparate mit der starken alkalischen Lösung, welche man 12 bis 24 Stunden einwirken lässt (weniger gut durch Erwärmen auf 1 Stunde abzukürzen), und färbt mit Vesuvin nach, oder man benutzt die Anilinwasser-Farblösungen, von denen die von Neisser vorgeschlagene sich mir bis jetzt als die bequemste und zuverlässigste erwiesen hat: Färben in heissem Anilinwasser-Fuchsin, Entfärben durch Salpetersäure, Nachfärben mit Methylenblau. Tafel II, Fig. 9.

Einzelne Sporen färben sich übrigens schon in gesättigten, wässrigen und verdünnten alkoholischen Lösungen bei gleichzeitigem Erwärmen. Die Differenzen unter den Sporen scheinen in Bezug auf die Färbbarkeit kaum geringer, als unter den Bakterien selbst.

## Schnitt-Präparate.

Frische Organstückchen kann man mit dem Gefriermikrotom schneiden. Die Schnitte werden in $^1/_2$ % iger Kochsalzlösung aufgenommen und zum Theil frisch untersucht, zum Theil gefärbt. Zum letzteren Zwecke wird der Schnitt nach Weigert[1]) in der Lösung auf einem Spatel mit Hülfe von Nadeln gut ausgebreitet, dann

[1]) Virchow's Archiv für pathologische Anatomie, Bd. 84 1881, S. 290.

herausgenommen und die überschüssige Salzlösung mit Fliesspapier entfernt. Darauf bringt man den Schnitt, ihn langsam senkend, in absoluten Alkohol, in dem er mindestens so lange bleibt, bis alle beim Aufthauen entstehenden Luftblasen verschwunden sind. Dann kommt der Schnitt in Farblösungen, von denen für diesen Zweck Vesuvin sich am meisten bewährt hat, weil bei den anderen Farben der Schnitt länger im Alkohol bleiben muss. Nach Friedländer[1]) kann man den Schnitt auch aus der Kochsalzlösung in die braune Farblösung bringen, von dort auf kurze Zeit in Alkohol, dann in Glycerin oder in Nelkenöl und Balsam.

Für das Studium der Bakterien scheint mir die Anfertigung von frischen Schnitten zur Orientirung eine ganz überflüssige Arbeit. In derselben Zeit, in welcher man einen für diese Zwecke brauchbaren Schnitt macht, kann man ein ganzes Dutzend Deckglas-Trockenpräparate mit dem Gewebssaft anfertigen, welche über das Vorkommen und den Gehalt an Bakterien besser orientiren.

Zum genauen Studium des Vorkommens und der Vertheilung von Bakterien in den Geweben ist es erforderlich die Gewebe gut zu härten und aus den gehärteten Geweben mit dem Mikrotom Serien von feinen Schnitten anzulegen. Diese Schnitte werden theils ungefärbt, theils nach vorausgegangener Färbung untersucht. Da sowohl die Färbung selbst als die zur guten Färbung erforderliche maximale Entfärbung sehr abhängig ist von dem durch die Härtung herbeigeführten Zustande der Präparate, so ist man für die Bakterien-Präparate in erster Linie auf den absoluten Alkohol als Härtungsmittel angewiesen. Die Färbungsfähigkeit der mit anderen Mitteln, wie Chromsalzen, gehärteten Gewebe ist inconstant; möglicherweise sind aber diese Härtungsmittel für andere parasitäre Mikroorganismen günstiger als Alkohol (cfr. S. 51).

Die Färbbarkeit der Albuminate hängt sehr von ihrem Gehalte an Wasser ab. Da das durch Alkohol coagulirte Eiweiss eine gewisse Menge von Wasser zurückhält, welches ihm erst allmählich im Verlaufe einiger Tage durch den absoluten Alkohol ganz ent-

[1]) Mikroskopische Technik, 2. Aufl., S. 119.

zogen wird, so muss die Härtung in Alkohol so lange dauern, bis ganz constante Verhältnisse eingetreten sind. Zu diesem Zwecke lässt man kleine Stückchen der Organe von etwa Haselnussgrösse mindestens drei Tage in einer grossen Menge von oft gewechseltem absolutem Alkohol.

In den frischen oder gehärteten, nicht gefärbten Schnitten werden Bakterien nachgewiesen durch ihre Resistenz gegen Säuren und Alkalien[1]). Die Schnitte werden durch 50 % ige Essigsäure oder 1 bis 3 % ige Kali- oder Natronlauge sehr stark aufgehellt. Die Bakterien widerstehen dieser Behandlung nach v. Recklinghausen (S. 26). Alte Spirituspräparate werden in diesen Lösungen bis zur Blasenbildung erwärmt. Die Bakterien sind in solchen durchsichtig gemachten Präparaten zum Theil an der charakteristischen Form der einzelnen Bakterien zu erkennen, wie es von Baumgarten (S. 26) für Tuberkelbacillen, von Friedländer für Ileotyphus gefunden wurde. Bei den nicht durch scharfe Form der Einzelindividuen markirten Bakterien, besonders den Kokken, macht sich die Gruppenbildung, Diplokokken, Sarcina, Torula, Zoogloea, bemerkbar. Diese gleichmässigen Körner widerstehen dem Aether und Chloroform, welche Fetttröpfchen, mit denen eine Verwechslung möglich wäre, auflösen. In den Gefässen markiren sich die Kokkenanhäufungen nach v. Recklinghausen bisweilen dadurch, dass sie in Folge ihres Wachsthums die Gefässe varicös auftreiben. „Wenn wir in einem Schnitte, der vom frischen oder in Alkohol gehärteten Organ herrührt, Haufen oder Ketten kleiner Körnchen finden, die unter sich von annähernd gleicher Grösse sind, die so wohl der Behandlung mit Alkohol und Aether, als auch der energischen Einwirkung von concentrirter Essigsäure und der Alkalien auch beim Erwärmen resistiren, so sind wir nach Friedländer's Zusammenfassung[2]) berechtigt, die Körner als Organismen anzusprechen."

Wichtiger ist der Nachweis der Bakterien in den durch Alkohol gehärteten Schnitten durch Färbung.[3]) Die zur

[1]) cfr. Friedländer's Zusammenstellung in der Mikroskopischen Technik, 2. Aufl., S. 45.

[2]) Mikroskopische Technik, 2. Aufl., S. 46.

[3]) Litteratur, cfr. S. 29.

Erreichung constanter Verhältnisse erforderliche Dauer der Alkoholhärtung setzt die Färbbarkeit vieler Elemente herab, so dass die Färbung der gehärteten Schnitte in der Regel eine quantitative Steigerung der für Deckglas-Trockenpräparate ausgebildeten Färbemethodik erfordert. Die Schnitte werden erst überfärbt und dann durch secundäre „maximale" Entfärbung der richtige Grad der Kern- und Bakterienfärbung herbeigeführt.

Die in Alkohol geschnittenen und in Alkohol aufgenommenen Schnitte werden in eine gesättigte wässrige oder verdünnte alkoholische Lösung der Farben gebracht, in der sie 5 Minuten bis eine halbe Stunde verweilen. Durch Erwärmen auf 40 bis 50° kann die Zeit etwas abgekürzt und vielfach auch die Intensität der Färbung gesteigert werden. Gentianaviolett wird nach Weigert sehr vortheilhaft auch in 1 % iger wässriger Lösung verwandt. Die Schnitte werden dabei diffus gefärbt.

Bei dieser Färbungsweise unterlässt man die früher vielfach übliche Entfärbung durch Essigsäure, weil manche Bakterien, wie Rotz- und Typhusbacillen, in kurzer Zeit den Farbstoff mehr oder weniger vollständig verlieren. Die Schnitte werden zur Entfernung eines Ueberschusses an Farbe aus der Farblösung in destillirtes Wasser gebracht. Im destillirten Wasser werden sie sorgfältig auf einem Spatel ausgebreitet und mit diesem Spatel langsam senkend in absoluten Alkohol gebracht zur Differenzirung der Bakterien und Kerne und zum Entwässern. Im Alkohol, der ganz säurefrei sein muss, verbleiben sie einige Minuten; dann werden sie in Terpentinöl oder Cedernöl übertragen zum Aufhellen und können in diesem Oel direct untersucht werden. Zum Conserviren saugt man das Oel mit Fliesspapier ab und legt dann in Canadabalsam ein. Da der Balsam in den Immersionsflüssigkeiten sich löst, muss man den Balsam genügend hart werden lassen, um nicht durch Verschieben des Deckgläschens eine Lösung des Balsams herbeizuführen. Will man frisch in Balsam eingelegte Präparate untersuchen oder versenden, so umrandet man das Deckglas zur Fixirung auf dem Objectträger am besten mit Schellack oder Maskenlack, der sich in der Immersionsflüssigkeit

nicht löst. Auch für Schnitte sind möglichst verschiedene Farben in Anwendung zu ziehen.

Bei Anwendung dieser Färbemethode färben sich die Typhusbacillen schlecht; die Recurrensspirochäten nur in braunen Farben und auch dann noch nicht gut; die Leprabacillen schlecht in braunen, gut in rothen und blauen Farben.

Für diese Fälle lässt sich ausreichende Intensität der Färbung erzielen durch Anwendung der starken alkalischen Lösung (S. 35), welche sich dadurch nach Löffler als die universellste aller bis jetzt für Schnitte versuchten Lösungen erweist.

Die Schnitte werden einige Minuten in diese Lösung gelegt, dann einige Sekunden in $^1/_2$ bis 1 %iger Essigsäure hin und herbewegt um den überschüssigen Farbstoff aus den Geweben zu entfernen und Bakterien und Kerne zu differenziren, kommen dann zum Entwässern einige Minuten in Alkohol, werden in Cedernöl aufgehellt und in Canadabalsam conservirt. Bei dieser Behandlung färben sich viele sonst sehr schwer zu färbenden Bakterienarten fast gleich gut: Tuberkelbacillen eben so gut, wie bei den andern Methoden; ebenso Rotzbacillen, welche bei Anilinwasser-Farblösungen durch die Essigsäure ganz entfärbt werden; Typhusbacillen; Recurrensspirochäten, welche sich auf andere Weise in Schnitten bis jetzt nur höchst mangelhaft haben färben lassen. Bei den meisten anderen Bakterien ist allerdings keine so auffallende Differenz zu Gunsten dieser Methode bemerkbar. Die vergleichende Färbung durch Anwendung wässriger und alkalischer Lösungen lässt bisweilen schon rein mikroskopische Differenzen erkennen, welche zur Differentialdiagnose bei morphologisch ähnlichen Arten brauchbar sind.

Zur isolirten Färbung der Bakterien in Schnitten bringt man nach Koch die Schnitte aus der Farblösung in eine Lösung von kohlensaurem Kali, welche man sich derart herstellt, dass man eine gesättigte Lösung dieses Reagens mit gleichen Theilen destillirtem Wasser verdünnt. In dieser Lösung bleiben die Schnitte ungefähr 5 Minuten, werden dann mit dem Spatel in Alkohol übertragen, darauf in Cedernöl aufgehellt und in Balsam conservirt. Bei dieser Methode kann man verschiedene Farben anwenden. Waren

die Schnitte in Anilinöl-Gentianaviolett gefärbt, so ist die Isolirung nach der Gram'schen Methode (S. 45) für die meisten Bakterien noch schöner. Die Schnitte kommen aus dem Alkohol, in dem sie nach dem Schneiden aufbewahrt wurden, 1 bis 3 Minuten (Tuberkelbacillen in Schnitten 12 bis 24 Stunden) in die Anilinwasser-Gentianaviolett-Lösung, dann werden sie ohne oder nach einer leichten Abspülung in Alkohol in die Jod-Jodkaliumlösung übertragen, in der sie 1 bis 3 Minuten verweilen. In der Jodlösung tritt ein Niederschlag ein und die Schnitte werden schwarz-purpurroth gefärbt. Dann kommen die Schnitte in Alkohol bis zur vollständigen Entfärbung, darauf in Oel, dann in Balsam. Die Bakterien erscheinen dann dunkelblau, die Kerne und das Gewebe schwach gelblich. Die Kapselkokken der Pneumonie (wenigstens in der Regel) und eben so die Typhusbacillen werden ebenso entfärbt wie die Kerne.

Doppelfärbungen in Schnitten lassen sich derart herstellen, dass man die nach Gram isolirt gefärbten Schnitte nach dem Entfärben in Alkohol in eine schwache wässrige Lösung von Vesuvin bringt, dann wieder in Alkohol entwässert, in Oel aufhellt und in Balsam einschliesst. Die Kerne erscheinen dann braun, die Bakterien bleiben blau.

Carmin und Hämatoxylin färben, wie schon erwähnt, nicht alle Bakterien und auch diese nicht so gut wie die basischen Anilinfarben, während sie Kernfärbemittel ersten Ranges sind. Man kann deshalb nach Koch's Methode isolirt blau gefärbte Bakterien-Schnittpräparate in eine kernfärbende Carminlösung (roth gefärbte in Hämatoxylin) etwa 10 Minuten bringen um die Kerne nachzufärben; dann kommt wieder Alkohol, Oel, Balsam.

Waren die Schnitte in concentrirten wässrigen oder verdünnten alkoholischen Lösungen diffus gefärbt, so bringt man sie zuerst in Alkohol zur Differenzirung der Bakterien und der Kerne, dann kommen sie zur Entfernung des Alkohols einen Moment in Wasser und dann in die Carmin- oder Hämatoxylinlösung, je nachdem die erste Färbung mit blauen oder rothen Anilinfarben vorgenommen war. Für diese Fälle empfieht sich nach Weigert besonders 1 % ige wässrige Lösung von Gentianaviolett und Nachfärben mit Picrocarmin.

Die Zeit der gewöhnlichen Kernfärbung von ca. 10 Minuten muss dabei etwas überschritten werden, weil das Carmin erst das Gentianaviolett aus den Kernen verdrängen muss. Die Zeit beträgt etwa $^1/_2$ bis 1 Stunde. Bei Kokken wird bei noch längerer Einwirkung manchmal durch das Carmin auch die Anilinfärbung der Bakterien beeinträchtigt.

Diese differente Election der Bakterien und Kerne kann man vielleicht noch vortheilhafter derart verwenden, dass man die Schnitte erst etwa 10 bis 15 Minuten in die Carmin- oder Hämatoxylinlösung bringt; in dieser Zeit werden die Kerne gut und dauerhaft gefärbt, während die Bakterien nicht oder nur schlecht gefärbt sind. Nach Abspülen in Wasser kommen die Schnitte dann in die basische Anilinfarbe, in welcher sich die Bakterien färben, während der erste Farbstoff aus den Kernen nicht verdrängt wird. Dann folgt wieder Alkohol, Oel, Balsam. Wendet man Picrocarmin an, statt des gewöhnlichen Carmin, so erhält man dreifache Färbungen (S. 36).

Eine Verwechslung mit Kokken können in Schnitten leicht die sogenannten Mastzellen herbeiführen. Es sind dies kugelige oder spindelförmige Zellen mit grobkörnigem Protoplasma, dessen Granulationen sich den bassischen Anilinfarben gegenüber wie die meisten Kokken verhalten. Die Kerne dieser Zellen färben sich nicht, so dass leicht der Anschein einer Kokkenkolonie entsteht, mit der dieselben schon oft verwechselt wurden.

Diese Granulationen zeigen nicht die Resistenz gegen Säuren und Alkalien und sind nie von so ganz gleicher Grösse wie die Kokken; weiter sind sie durch den Ort ihres Vorkommens meist zu erkennen, da sie gewöhnlich der Gefässwand aufsitzen. Ein genaues Studium dieser Zellen ist höchst nothwendig und hierzu empfiehlt sich besonders das Ohr der weissen Mäuse. Eine definitive Entscheidung ist oft nur durch isolirte Bakterienfärbung zu erreichen, bei der die Mastzell-Granulationen ungefärbt bleiben.

Zur gleichzeitigen Färbung der meisten Kokken und der Mastzellen empfiehlt sich nach Ehrlich-Westphal folgende Lösung, welche auch die Unterscheidung anderer Bakterien von Kernen gestattet.

100 ccm Partsch-Grenacher'sches Carmin (Carmin pur. 2,0, aq. 200,0, Alaun 5,0 eine viertel Stunde gekocht, filtrirt, Zusatz von acid. carbol. 1,0),
100 ccm Glycerin,
100 ccm conc. alkohol. Lösung von Dahlia,
20 ccm Eisessig.

In dieser Lösung bleiben die Schnitte 24 Stunden, dann kommen sie einige Minuten in Alkohol, darauf in Oel und dann in Balsam. In dieser Lösung nehmen die Kerne eine rothe, die Mastzell-Granulationen und die Bakterien eine blauviolette Farbe an.

Zur Darstellung der Kapselkokken der Pneumonie wendet Friedländer (mündliche Mittheilung) jetzt an:

| | |
|---|---|
| conc. alkohol. Gentianaviolett-Lösung . | 50 |
| Aq. dest. . . . . | 100 |
| Ac. acet. . . . . | 10 |

Die Schnitte bleiben 24 Stunden in der Lösung, kommen zur Differential-Entfärbung einige Minuten in 1 % ige Essigsäure, dann folgen Alkohol, Oel, Balsam wie gewöhnlich. Eine etwaige Differentialdiagnose wird mikroskopisch möglich dadurch, dass bei der Gram'schen Methode diese Kapselkokken sich entfärben, während die übrigen Kokken (alle?) die Farbe behalten.

Babes[1]) empfiehlt Safranin zur Färbung der Bakterien in Schnitten. Man lässt die Schnitte eine halbe Stunde in einer Mischung liegen, welche aus gleichen Theilen einer concentrirten wässrigen und einer concentrirten alkoholischen Lösung besteht. Dann werden die Schnitte kurz in Wasser und einige Minuten in Alkohol gebracht; darauf folgt Terpentinöl und Balsam. Die Bakterien sind bisweilen fast isolirt roth gefärbt. Die Methode bietet keine Vortheile, da sich die Kokken wohl gut, die übrigen Bakterien zum Theil gar nicht, zum Theil viel schlechter färben als bei den anderen Methoden.

Die Typhusbacillen färben sich bei der gewöhnlichen Art schlechter als die meisten übrigen Bakterien, selbst wenn man die Lösungen erwärmt. Nach Gaffky[2]) lässt man die Schnitte am besten 20 bis 24 Stunden in einer tiefblauen undurchsichstigen

[1]) Archiv f. mikroskopische Anatomie, Bd. 22, S. 359.
[2]) Mittheilungen 1884, Bd. II., S. 378.

Lösung, welche durch Eingiessen einer gesättigten alkoholischen Lösung von Methylenblau in destillirtes Wasser jedesmal frisch bereitet wird. Dann werden die Schnitte in ganz säurefreiem destillirtem Wasser abgespült, in absolutem Alkohol entwässert, in Terpentinöl aufgehellt und in Balsam conservirt. Auch in der alkalischen Lösung von Methylenblau färben sie sich gut, während sie bei der Gram'schen Methode entfärbt werden.

Die Rotzbacillen werden nach Färben in Anilinwasser-Farblösungen durch essigsäurehaltiges Wasser entfärbt, dagegen durch die alkalische Lösung von Methylenblau gut gefärbt.

Die Leprabacillen färben sich in Schnitten wie die Tuberkelbacillen. Zur Differentialdiagnose empfiehlt desshalb Baumgarten, (S. 49) die Schnitte 12 bis höchstens 15 Minuten in verdünnte alkoholische Lösung von Fuchsin zu legen, dann eine halbe Minute in saurem Alkohol (1 Theil Salpetersäure zu 10 Theilen Alkohol) zu entfärben, auswaschen in destillirtem Wasser, entwässern in Alkohol, dann Oel, Balsam. In dieser Zeit färben sich die Leprabacillen gut, die Tuberkelbacillen dagegen nicht.

Die Tuberkelbacillen kann man darstellen, indem man die Schnitte etwa 12 Stunden in die schwache alkalische, oder eine Stunde in die starke alkalische Lösung von Methylenblau (S. 35) einlegt, darauf einige Minuten in eine concentrirte wässrige Lösung von Vesuvin und dann in Alkohol bringt. Auch mit der Gram'schen Methode kann man sie sichtbar machen. Zur Differentialdiagnose färbt man die Schnitte am sichersten nach den früher (S. 45) dargelegten Principien in Anilinwasser-Farblösungen nach Ehrlich oder Weigert-Koch.

Die Schnitte bleiben 12 bis 20 Stunden in Anilinwasser-Methylviolett (oder Fuchsin);
darauf einige Sekunden in verd. Salpetersäure (1:3 bis 4);
Spülen in 60 % igem Alkohol einige Minuten;
Nachfärben in verdünnter wässriger Lösung von Vesuvin (resp. Methylenblau);
Spülen in 60 % igem Alkohol;
Entwässern in absolutem Alkohol;
Aufhellen in Cedernöl und ev. Einlegen in Canadabalsam.

Die Vibrionen der Cholera asiatica färben sich in Schnitten wie die meisten Bacillen. Die Recurrens-Spirochäten färben sich in wässrigen und glycerinigen Lösungen von Vesuvin, nicht von anderen Farben, aber schlecht. Dagegen färben sie sich gut in der starken alkalischen Lösung von Methylenblau

Eine kurze Besprechung erfordern noch

***die epiphytischen Bakterien***

und die ähnlich zu beobachtenden übrigen epiphytischen Mikroorganismen. Ob sich unter den epiphytischen Bakterien parasitische befinden, ist bis jetzt nicht sicher entschieden. Die Hauptschwierigkeit dieser Untersuchungen liegt in der Anwesenheit vonFett.

Balzer[1]) wäscht die Hautschuppen mit Aether und Alkohol, und untersucht dieselben nach dem Färben mit alkoholischer Eosinlösung oder ohne vorausgegangene Färbung in 40%iger Kalilauge. Nach von Sehlen[2]) werden die Haare nach der Entfettung auf kurze Zeit in Alkohol gebracht, und kommen dann in eine dünne Anilinöl-Fuchsinlösung. Darauf werden dieselben mit salzsaurem Alkohol ausgewaschen, der Rest der Säure mit destillirtem Wasser entfernt, eine Doppelfärbung mit concentrirter wässriger Lösung von Gentianaviolett herbeigeführt, mit Alkohol differenzirt wie sonst.

Nach Bizzozero[3]) tupft man Deckgläser auf die Oberhaut, zieht dieselben dreimal durch die Flamme, entfettet mit Chloroform und färbt mit Fuchsin oder Gentianaviolett. Die Epidermisschuppen kommen zum Entfetten erst einige Stunden in Alkohol, darauf ein oder zwei Tage in Aether, dann wieder in Alkohol. Nach dem Entfetten stehen drei Wege offen:

1. Man bringt auf den Objectträger einen Tropfen, welcher aus gleicher Menge Wasser und Essigsäure besteht, oder einen Tropfen einer 10%igen Aetzkalilösung. In diesem Tropfen lässt man ein entfettetes Epidermisschüppchen einige Minuten aufquellen, legt das

[1]) Contribution à l'étude de l'erythème tricophytique. Arch. de Physiol. 3. sér. 1883. Bd. 1, S. 171.

[2]) Mikrokokken bei Area Celsi. Fortschritte der Medicin 1883, No. 23.

[3]) Ueber die Mikrophyten der normalen Oberhaut des Menschen. Virchow's Archiv 1884. Bd. 98, S. 441.

Deckglas auf. Zum Conserviren der Essigsäurepräparate lässt man vom Rande her Glycerin zutreten.

2. In einem mit Methylenblau leicht gefärbten Glycerin wird ein Epidermisschüppchen mit Nadeln ausgebreitet. Dabei färben sich Pilze blau, während die Epidermis ungefärbt bleibt.

3. Auf ein Deckgläschen bringt man einen Tropfen 50%iger Essigsäure und trägt die entfetteten Epidermisschuppen ein. Nach einer viertel Stunde oder mehr, wenn die Schuppen gut aufgequollen sind, werden dieselben mit Nadeln ausgebreitet, dann dampft man den Essig bei gelinder Wärme ab; man kann zu diesem Zwecke das mit Pincette gefasste Deckglas hoch über einer Flamme hin und her bewegen. Nach dem Abdampfen wird das lufttrockne Präparat dreimal durch die Flammen gezogen und dann gefärbt, indem man einen Tropfen einer wässrigen Lösung von Methylviolett, Gentianaviolett, Vesuvin, Methylenblau oder einer verdünnten alkoholischen Lösung von Fuchsin 10 bis 30 Minuten einwirken lässt, dann wird sorgfältig ausgewaschen, getrocknet und in Balsam conservirt. Methylenblau wird von Bizzozero vorgezogen, weil es nur die Pilzelemente färbt; ich habe es am vortheilhaftesten gefunden, die starke alkalische Lösung von Methylenblau etwa 5 Minuten einwirken zu lassen. Mit dieser kleinen Modification scheint mir diese dritte Methode von Bizzozero zur Zeit am meisten für den Nachweis epiphytischer Mikroorganismen zu leisten.

Kurz erwähnen will ich, dass bei ächter Mykose die Mycelfäden der Schimmelpilze in den Schnitten am besten durch die Methode von Löffler (S. 63) nachgewiesen werden. Der Nachweis des Strahlenpilzes in Gewebsschnitten gelingt meist ohne besondere Präparation. Wegen häufiger Verkalkung der Actinomycesdrusen wird es oft nöthig die Entkalkung vorauszuschicken resp. die Härtung in salzsäurehaltigem Alkohol und dann erst in absolutem Alkohol vorzunehmen. Die Färbung gelingt nach Weigert[1]), indem man die Schnitte eine Stunde in Orseille-Lösung bringt. Reine Orseille, welche zur Befreiung von Ammoniak längere Zeit an der Luft gelegen hat, wird nach Wedl in einem Gemisch von 20 ccm abso-

[1]) Virchow's Archiv 1881, Bd. 84, S. 245.

lutem Alkohol, 5 ccm Essigsäure, 40 ccm destillirtem Wasser in solcher Menge gelöst, dass die Flüssigkeit dunkelroth, und nach dem Filtriren rubinroth erscheint. Dann spült man die Schnitte mit Alkohol ab, bringt sie in 1 %ige wässrige Lösung von Gentianaviolett, und behandelt sie nun wie bei der Bakterienfärbung. In diesen Schnitten sind die Kerne blauviolett, das Bindegewebe schwach orange, die innern Parthien des Strahlenpilzes verwaschen blau, die Aussenparthien rubinroth gefärbt und oft durch eine farblose Zone von den centralen Parthien getrennt.

Für freie Amöben und membranlose Zellen (S. 51) empfiehlt Brass[1]) eine Lösung aus einem Theil Chromsäure, einem Theil Platinchlorid, einem Theil concentrirter Essigsäure und 400 bis 1000 Theilen Wasser. Zur Härtung der Gewebe, bei denen die Zellen möglichst wenig verändert werden sollen (cfr. S. 60), empfiehlt Brass $^1/_8$ bis $^1/_2$ %ige Chromsäurelösung, der später noch einige Tropfen concentrirter Chromsäurelösung zugesetzt werden. Nach einiger Zeit kommt das Präparat erst in 30 %igen Alkohol und allmählich zur vollständigen Wasserentziehung in immer stärkeren, schliesslich in absoluten Alkohol. Auch die Mischung von Chromsäure, Platinchlorid und Essigsäure ist zum schonenden Härten zu verwenden, besonders, wenn man auf 100 gr etwa 4 bis 6 Tropfen 1 %ige Ueberosmiumsäure zufügt. Die Färbung erfolgt durch Borax- oder Ammoniakcarmin, oder in Hämatoxylinlösung.

[1]) Die Methoden bei der Untersuchung thierischer Zellen. Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884, S. 39.

## III. Kultur-Methoden; Reinkulturen.

Zuerst von Ehrenberg, später besonders von Cohn und Schröter war die Ansicht aufgestellt worden, dass es unter den Bakterien ächte Arten giebt. Auf Grund der Untersuchungen von Cagniard-Latour und Schwann hatte Turpin für die Fermentationen, Henle für die Infectionskrankheiten deducirt, dass specifische Umsetzungen und Krankheiten durch artächte Mikroorganismen verursacht werden, und Pasteur hatte durch Uebertragungsversuche experimentelle Beweise dafür gebracht, dass den specifischen Umsetzungen specifische, differente Mikroorganismen zu Grunde liegen. Diese Anschauungen sowohl, als die der Gegner, welche für Inconstanz von Form und Wirkung eintraten, können nur einwandsfrei geprüft werden, wenn die Bakterien rein und frei von allen Beimengungen zu Beobachtungen kommen. Deshalb ist das Bemühen vieler Forscher seit langem schon darauf gerichtet, die Kulturmethoden der Bakterien zu einwandsfreien Methoden von Reinkulturen zu gestalten.

### 1. Durchsichtige, flüssige Nährmedien.

Diese Methode ist die älteste und liegt allen Gährungsexperimenten der früheren Zeit zu Grunde. Für Bakterien wurde sie von Pasteur[1]) bei seiner ersten Arbeit zur vitalistischen Gährungstheorie schon angewendet. Sie besteht im Princip darin, dass man eine Spur der ursprünglichen, Gährungsorganismen enthaltenden Flüssigkeit, oder eine Spur der in derselben enthaltenen „Hefe“ in eine der ursprünglichen möglichst ähnlich zusammengesetzte Flüssigkeit überträgt, von dieser wieder eine Spur in eine dritte Lösung

[1]) Mémoire sur la fermentation appelée lactique. Compt. rend. 1857, Bd. 45, S. 913.

u. s. w. Die Pasteur'sche Schule hat an diesem Princip der Verwendung durchsichtiger flüssiger Nährmedien bis jetzt fast ganz ausschliesslich festgehalten, vielfach noch in der ursprünglichen Form, oft mit den später zu besprechenden Modificationen der Verdünnungsmethode. Auch die vorwiegend morphologischen Untersuchungen von Cohn waren besonders an diese Methode geknüpft.

In Flüssigkeiten, welche durch Bakterien eine Zersetzung erleiden, sieht man bald diffuse Trübungen eintreten, bald einen Bodensatz, bald eine, meist „Kahmhaut" genannte Decke sich bilden. Bei Uebertragungen hat man jede derartige, dem Auge sich bietende Differenz zu beachten, und von jedem different erscheinenden Theile auf neue Lösungen zu übertragen. Eine solche Uebertragung in eine neue Lösung, kurz Impfung genannt, geschieht derart, dass man eine vorher ausgeglühte und wieder abgekühlte Platinnadel, gerade oder zur Oese gebogen, in die zu übertragende Bakterienhaut, oder die Trübung eintaucht, und dann die so entnommene „Spur" in die neue Lösung bringt; statt der Platinnadeln kann man auch zur Capillare ausgezogene Glasröhren verwenden, mit denen man einen Tropfen der Flüssigkeit überträgt.

Eine solche „Spur" oder ein „Bakterientropfen" enthält meist grosse Mengen von Bakterien. In Folge dessen entwickelt sich zunächst diejenige Art, welche in der neuen Lösung die besten Existenzbedingungen findet. Wenn das Nährmaterial für die eine Art erschöpft ist, kann sich dann später, vorausgesetzt, dass sich in der übertragenen Spur oder dem Tropfen mehrere Arten befanden, vielleicht die eine oder andere zuerst unterdrückte Form entwickeln. Kleine Differenzen lernte man in Bezug auf die Reihenfolge, in der sich dieser Kampf ums Dasein abspielte, kennen, je nachdem man die geimpften Lösungen bei niedriger oder höherer Temperatur hielt. Schliesslich erhält man bei irgend einer Uebertragung einmal eine mehr oder weniger reine Kultur von einem Organismus. Aber dies ist durchaus nicht immer, sondern eher selten, der Organismus, welchen man wirklich isoliren will; gewöhnlich ist die schliesslich resultirende „Reinkultur" eine der gewöhnlichen saprophytischen Arten, welche unter den gewählten Bedingungen die anderen empfindlicheren Arten verdrängt; daher rührt es, dass bei dieser Art der Kul-

turen sich so oft bakterium termo und bacillus subtilis einstellen, welche in der älteren Bakterienliteratur eine viel grössere Rolle spielen, als jetzt.

Man lernte auf diese Weise eine Abhängigkeit der Bakterienvegetation vom Nährboden kennen. Dies führte dazu solche Flüssigkeiten zu wählen, welche möglichst vielen Arten annähernd gleich günstige Bedingungen bieten sollten. Von diesen künstlichen Normallösungen für die Bakterien ist die älteste die „Pasteur'sche Flüssigkeit“[1]), welche aus 1 Theil weinsaurem Ammoniak, 10 Theilen Candiszucker und der Asche von einem Theil Hefe auf 100 Theile Wasser besteht.

A. Mayer[2]) wandte statt der Hefenasche eine Lösung der in der Hefenasche enthaltenen Salze an. Cohn[3]) gewann dann, indem er diese Mayer'sche Normallösung der mineralischen Nährsalze benutzte und den Zucker wegliess, folgende „normale Bakteriennährflüssigkeit“:

0,5 gr phosphorsaures Kali, 0,5 gr krystallisirte schwefelsaure Magnesia, 0,05 gr dreibasisch phosphorsaurer Kalk auf 100 ccm destillirtes Wasser; hierin wurde 1,0 gr weinsaures Ammoniak aufgelöst.

Nägeli[4]) ermittelte dann für die niederen Pilze und die Spaltpilze, dass der Stickstoff am besten assimilirt werden kann, wenn er als $NH_2$, weniger leicht, wenn er als NH, noch schlechter, wenn er als NO vorhanden ist, und gar nicht, wenn er mit andern Elementen als H und O verbunden ist, so dass sich von den löslichen Albuminaten bis zu Ammoniak und Salpetersäure eine absteigende Skala construiren lässt. Für den Kohlenstoff stellte er folgende Skala auf:

---

[1]) Annales de Chimie et de Physique, Bd. 58, S. 323, deutsch von Griessmayer: Die Alkohol-Gährung 1878.

[2]) Unters. über die alkohol. Gährung 1869, Lehrbuch der Gährungs-Chemie, 3. Aufl., 1879.

[3]) Beiträge zur Biologie der Pflanzen I, 2. Heft, S. 195.

[4]) Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Untersuchungen über niedere Pilze 1882, S. 1.

1. die Zuckerarten;
2. Mannit; Glycerin; die Kohlenstoffgruppe im Leucin;
3. Weinsäure; Citronensäure, Bernsteinsäure; die Kohlenstoffgruppe im Asparagin;
4. Essigsäure; Aethylalkohol; Chinasäure;
5. Benzoesäure; Salicylsäure; die Kohlenstoffgruppe im Propylamin;
6. Die Kohlenstoffgruppe im Methylamin; Phenol.

Für die Assimilationsfähigkeit der vereinigten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen stellte Nägeli folgende, von den besser zu den schlechter nährenden Substanzen fortschreitende Stufenreihe auf:

1. Eiweiss (Pepton) und Zucker;
2. Leucin und Zucker;
3. Weinsaures Ammoniak oder Salmiak und Zucker;
4. Eiweiss (Pepton);
5. Leucin;
6. Weinsaures Ammoniak; bernsteinsaures Ammoniak; Asparagin;
7. Essigsaures Ammoniak.

Ad 1, ist zu beachten, dass die Bakterien die Fähigkeit besitzen müssen, das Eiweiss in Pepton überzuführen und Milchzucker und Rohrzucker zu hydratisiren, sodass man am sichersten Pepton und Traubenzucker nimmt.

Für die Mineralbestandtheile ermittelte Nägeli am besten:

Kaliumphosphat 0,1 gr, Magnesiumsulfat 0,02 gr, Calciumchlorid 0,01 gr auf 100 Theile Flüssigkeit. Darf die Reaction sauer sein, so nimmt Nägeli saures Kaliumphosphat ($KH_2PO_4$), für neutrale und alkalische Lösungen Dikaliumphosphat ($K_2HPO_4$). Je schlechter nährend die N- und C-Gruppen sind, desto weniger concentrirt darf die Salzlösung sein, während bei gut nährenden C- und N-Gruppen diese Normalconcentration überschritten werden darf. Daraus leitet Nägeli folgende „Normalflüssigkeiten für Spaltpilze“ her:

I. Wasser 100 ccm, weinsaures Ammoniak 1 gr, $K_2HPO_4$ 0,1 gr, $MgSO_4$ 0,02 gr, $CaCl_2$ 0,01 gr.

II. Wasser 100 ccm, Eiweisspepton 1 gr, $K_2HPO_4$ 0,2 gr, $MgSO_4$ 0,04 gr, $CaCl_2$ 0,02 gr.

III. Wasser 100 ccm, Rohrzucker 3 gr, weinsaures Ammoniak 1 gr, $K_2HPO_4$ 0,2 gr, $MgSO_4$ 0,04 gr, $CaCl_2$ 0,02 gr.

Statt 1 gr weinsaures Ammoniak kann in III dienen, die gleiche Menge eines andern Ammoniaksalzes, oder 0,5 gr salpetersaures Ammoniak, oder 0,7 gr Asparagin, oder 0,4 gr Harnstoff.

Statt der Nährsalze kann man sehr oft bequemer 0,1 % Fleischextract anwenden. Für die Gährungsversuche resultiren daraus, nach Fitz[1]), Lösungen aus 3 % Zucker oder Mannit, Glycerin etc. und 0,1 % Fleischextract, denen eine geringe Menge von reinem Calciumcarbonat zugesetzt wird.

Nach den bisherigen Erfahrungen über Kulturen in Flüssigkeiten wird man gut thun, wie es auch in den Versuchen von Fitz der Fall war, die Normalnährflüssigkeiten mit besonderer Rücksicht auf den concreten Fall zu wählen. In Ermangelung anderer Anhaltspunkte, wählt man, wie in den ersten Versuchen von Pasteur, zum Ausgang die Flüssigkeit, in welcher die Bakterien spontan beobachtet wurden. Für Mikroorganismen, welche auf festen Substraten beobachtet wurden, stellt man sich Decocte oder Infuse aus diesem Substrate her, von frischem Mist, von süssen, getrockneten Früchten, Heu, Wurzeln u. s. w.

„Eine Nährlösung, welche diejenigen Substanzen gelöst enthält, die in einem festen Substrate, worauf ein Pilz in der Natur vorkommt, sich finden, wird nach Brefeld[2]) auch mit aller Wahrscheinlichkeit ein geeignetes Substrat für die Entwicklung des Pilzes abgeben.“ Die Lösungen werden für Pilze meist schwach sauer gehalten, für Bakterien in der Regel durch Ammoniak oder Natrium-Carbonat neutralisirt oder schwach alkalisch gemacht, aufgekocht und filtrirt.

„Mit der Anwendung klarer, pilzfreier Nährlösungen, in welchen sich die Untersuchungen der Pilze durch directe Beobachtung mit

[1]) Ueber Spaltpilzgährungen VII. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1882, XV, S. 867.

[2]) Kulturmethoden zur Untersuchung der Pilze. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, Heft IV. 1881, S. 5.

derselben Leichtigkeit ausführen lassen, als ob sie in dem durchsichtigen Wasser lebten, wird die mycologische Untersuchung gleichsam in eine algologische umgewandelt, d. h. es sind mit den Nährlösungen die Bedingungen für die Entwicklung der Pilze künstlich hergestellt, unter welchen wir die Algen, die meistens das Wasser bewohnen, ohne weiteres natürlich antreffen."

Mit diesen Worten von Brefeld (l. c. S. 7) ist der Hauptvortheil der Nährlösungen auch für Bakterienkulturen treffend gekennzeichnet.

Diese filtrirten, klaren, in der Regel neutral reagirenden Lösungen müssen sicher sterilisirt werden. Zu diesem Zwecke nimmt man mit reiner, vorher erhitzter Pincette den sterilisirten Wattepfropf von dem sterilisirten Kolben oder Reagirglase (Abschnitt I, S. 15) ab, und legt ihn so bei Seite, dass er nicht beschmutzt werden kann. Dann wird unter Zuhülfenahme eines sterilisirten Trichters, oder von sterilisirten Pipetten, die Flüssigkeit in Kolben gebracht, welche etwa zur Hälfte, oder in Reagirgläser, welche zu einem Drittel gefüllt werden. Darauf wird der Pfropf wieder aufgesetzt. Oft wird es wünschenswerth noch eine doppelte Lage dichtes Filtrirpapier überzulegen, welches durch ein Gummiband festgehalten wird und verhütet, dass Staub direct auf die Watte fällt. Der Watteverschluss ist wohl bakteriendicht, aber nicht immer pilzdicht, was bei längerem Aufbewahren der sterilisirten Gefässe in feuchten Räumen zu beachten ist.

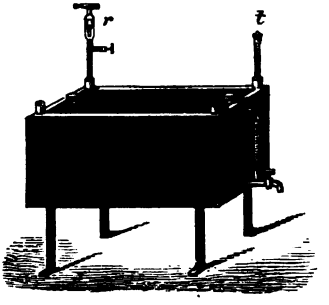
Das Sterilisiren geschieht nach einer der im ersten Abschnitte geschilderten Methoden, am besten in den meisten Fällen durch den Dampfsterilisirungs-Cylinder; kleinere Volumina Flüssigkeit, wie sie in den Reagirgläsern sich befinden, sind in $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden, grössere Kolben in 1 bis 2 Stunden, das Anwärmen nicht mitgerechnet, sterilisirt. Die gefüllten Reagirgläser werden am besten in einem Drahtkorbe (Fig. 3, d) in den Dampfcylinder eingesetzt.

Das Manipuliren mit den Flüssigkeiten geschieht zum Vermeiden der nicht oder schwer erkennbaren Luftinfection in einem möglichst keimfreien Orte, den man sich in einem Laboratorium dadurch herstellen kann, dass man in einem Glaskasten, ähnlich den zum Schutze der Waagen bestimmten, die Uebertragungen vornimmt.

Die Wände dieses Glaskastens werden mit feuchten Tüchern abgerieben, und die Luft in demselben durch Schüsseln mit warmem Wasser feuchtgehalten.

Zum Zwecke der Uebertragung wird mit einer graden Platinnadel oder mit einer Platinöse, welche vorher in der Flamme geglüht waren und wieder abgekühlt sind, eine sogenannte „Spur", oder mit einer Glascapillare ein Tropfen der zu übertragenden Lösung oder Hefe genommen, und unter möglichst schnellem Oeffnen des Wattepfropfs in die sterilisirte Lösung eingebracht, und der Wattepfropf wieder schnell aufgesetzt. Hatten die Lösungen lange ohne Schutz durch übergebundenes Filtrirpapier gestanden, so dass sich auf der Watte Bakterien- und Pilzkeime angesammelt haben können, so ist es vortheilhaft vor dem Oeffnen die oberen Schichten der Watte in der Flamme zu verkohlen. Es sind immer eine grössere Anzahl Einzelversuche gleichzeitig anzustellen. Die weiteren Uebertragungen geschehen in derselben Weise. Die geimpften Gläser werden, je nach dem Falle bei Zimmertemperatur gehalten oder höheren Temperaturen ausgesetzt. Für die höheren Temperaturen dient ein Brütofen oder Vegetationskasten aus Metall, mit doppelter Wandung zur Aufnahme von Wasser (Fig. 8); zum Schutze gegen Wärmeverlust dient eine Umkleidung von Filz oder Asbest oder man gibt dem Kasten noch eine dritte Wandung und füllt diesen zweiten Zwischenraum mit einer Schicht von Kieselguhr. Die Dimensionen richten sich nach dem Bedarf; die Form, viereckig oder cylindrisch, ist ziemlich gleichgültig. Bei den viereckigen ist eine innere Höhe und Breite von 25 ccm zu einer Länge von 50 bis 75 cm meist ausreichend. Zur Regulirung der Temperatur dienen Thermometer t, und Thermoregulatoren r. Diese letzteren kann man entbehren, wenn man einen kleinen Gasdruckregulator zwischen die Hauptleitung und den Brütofen einschaltet. Die Erwärmung geschieht durch Petroleumlampen oder Gas, welches man,

Fig. 8.



je nach der Grösse, durch eine verschiedene Zahl von leuchtenden Flammen eintreten lässt, die mit Glasmantel umgeben werden und nicht zurückschlagen können.

## 2. Die fractionirten Kulturen.

Die Uebertragungen in Flüssigkeiten wurden von Klebs[1]) zuerst für pathogene Bakterien versucht und dabei von ihm die Spur oder der Bakterientropfen anderer Autoren als fractio bezeichnet. Klebs verfuhr in der Art (l. c. S. 46), „dass er frisch ausgezogene und fein zugespitzte Capillarröhren auf den Boden der pilzhaltigen Flüssigkeit einsenkte und dort die Spitze abbrach; das herausgezogene Röhrchen wurde wieder zugeschmolzen, mit starkem Alkohol gereinigt und in einer pilzfreien Vegetationsflüssigkeit, die sich unter einer Oelschicht in einer Stöpselflasche befand, wiederum zerbrochen." Diese Prozedur wurde öfters wiederholt und „in dieser Weise ist es möglich (l. c. S. 47) etwaige Verunreinigungen, die in der Ursprungsflüssigkeit enthalten sein mögen, zu entfernen und denjenigen Körper rein zu erhalten, welcher in der ersteren in überwiegender Menge vorhanden war."

Trotz dieses subtileren Arbeitens und der schärferen Betonung des Ausganges von einem an Anzahl überwiegenden Organismus hat diese Methode keine wesentlichen Fortschritte gebracht. Auch bei dieser Complication der Pasteur'schen Methode stellte es sich leider evident heraus, dass in der Regel nicht der gewollte pathogene Organismus nach einer Reihe von Fractionen rein vorhanden war, sondern dass meist irgend eine, zu Anfang wegen der geringen Zahl vielleicht ganz übersehene oder durch Luftinfection oder Manipulationen eingebrachte Art von gewöhnlichen saprophytischen Bakterien rein gewonnen wurde, welche unter den gewählten Bedingungen besser fortkam, als die empfindlicheren pathogenen Bakterien, die von den ersteren meist sogar schnell überwuchert werden.

Man bekommt durch die bis jetzt geschilderten Methoden wohl schliesslich Reinkulturen, ohne es aber genügend in der Hand zu

[1]) Beiträge zur Kenntniss der Mikrokokken. Archiv für experimentelle Pathologie, I. Bd. 1873, S. 31.

haben, als Resultat diejenigen Arten rein zu erhalten, welche man rein haben will. Diese Methoden sind desshalb jetzt nur dann zu verwenden, wenn man irgend einen Organismus in Rein- oder Massenkultur erlangen will, dessen Herkunft und Wirkung mehr gleichgültig ist.

### 3. Undurchsichtige, feste Nährsubstrate.

Ausser in Flüssigkeiten beobachtet man Bakterien spontan auf festen Substraten. Lässt man z. B. eine Scheibe einer gekochten Kartoffel an der Luft stehen, so sieht man von der Kartoffelschale aus sich verschiedene schleimige Massen allmählich auf der Kartoffelfläche ausbreiten. Auf der Fläche selbst bilden sich kleine schleimige Pünktchen von verschiedener Farbe, welche einige Zeit ganz distinct für sich bestehen und erst bei weiterem Wachsthum sich mit anderen berühren, dieselben überwuchern oder von ihnen überwuchert werden.

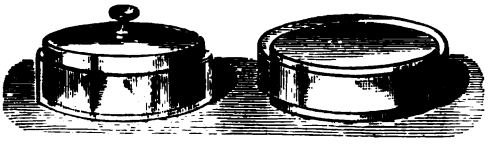
Diese Beobachtungen wurden von Schröter[1]) zuerst methodisch verwerthet zu Reinkulturen der Pigmentbakterien. Man überträgt mit einer Platinnadel eine Spur eines solchen Schleimtröpfchens, so lange es noch ganz isolirt ist, auf die Mitte einer frisch gekochten Kartoffelscheibe, welche aber zur Vermeidung der Luftinfection in einer feuchten Kammer gehalten wird.

Diese Kartoffelkulturen wurden von Koch noch wesentlich verbessert. Die Kartoffeln werden durch Bürsten zuerst von dem groben Schmutze gründlich befreit; dann werden sie $^1/_2$ bis 1 Stunde in eine 1 bis 5 p. M. Lösung von Sublimat gelegt; hierauf mit Wasser abgespült. Die so gereinigten Kartoffeln, deren anhängende Keime durch das Sublimat schon zum grössten Theile vernichtet sind, werden dann bis zur sicheren Sterilisirung gekocht. Dies geschieht im Dampfcylinder; man legt die Kartoffeln in das beigegebene Gefäss, welches man dann einsetzt. Nach Erreichung der Siedetemperatur bleiben die Kartoffeln bei dieser Temperatur ungefähr eine Stunde.

[1]) Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, I. Bd., Heft 2, 1872 (2. Abdruck 1881), S. 109.

Während des Abkühlens bereitet man sich feuchte Kammern. Grössere Glocken von der Form der Fig. 9 werden durch Spülen mit 1 p. M. Sublimat gereinigt. Auf den Boden der Glocke bringt man eine mehrfache Lage von Fliesspapier, welches mit ausgekochtem Wasser oder Sublimatlösung angefeuchtet wird. Sind die Kartoffeln abgekühlt, so werden sie mit der linken, durch 1 p. M. Sublimat sterilisirten Hand zwischen Daumen und Zeigefinger gefasst, mit einem sterilisirten Messer durchschnitten und mit der Schnittfläche nach oben in die feuchte Glocke eingelegt. Als Messer verwendet man gewöhnliche Küchenmesser, welche vorher durch Ausglühen in der Flamme sterilisirt werden und gegen Staub geschützt wieder abgekühlt sind; für jede Kartoffel benutzt man ein frisches Messer.

Fig. 9.



Dann entnimmt man mit einer vorher ausgeglühten und wieder abgekühlten Platinnadel eine Spur von einem noch ganz isolirten Schleimklümpchen, einer sogenannten „Colonie", und berührt nur eben die Mitte der Kartoffelscheibe oder macht quer über die ganze Fläche, dieselbe nur leicht ritzend, einige Impfstriche.

Im ersten Falle bildet sich auf der Mitte der Kartoffelscheibe eine allmählich nach dem Rande zu wachsende Colonie, im andern entwickeln sich in den Impfstrichen erst mehr oder weniger isolirte Colonien, welche sich später berühren und über den Impfstrich hinauswachsen. Für neue Uebertragungen verwendet man nur Colonien, welche man mit blosem Auge oder Loupe als rein erkennt und von denen man eine andere Spur durch ein Deckglaspräparat mikroskopisch controlirt hat. Ein Theil der Kulturen kann bei Zimmertemperatur, ein anderer Theil bei höherer Temperatur im Vegetations-Kasten gehalten werden.

Der grosse Vortheil dieser Methode gegenüber den früher geschilderten Methoden der durchsichtigen flüssigen Medien besteht darin, dass jeder absichtlich geimpfte oder durch Luftinfection auf die Kartoffelscheibe gelangte Keim isolirt am Orte seiner Berührung

mit der Kartoffel zu einer Colonie auswächst, während in den Flüssigkeiten sich differente Keime vermischen.

In Flüssigkeiten resultirt wohl auch eine Reinkultur, aber man hat es nicht sicher in der Hand den Organismus vorher zu bestimmen, der in der Reinkultur auftreten soll. In den Kartoffelkulturen dagegen ist man in der Lage, den gewünschten Organismus zu übertragen und dadurch von anderen zu trennen und so nach einigen Uebertragungen rein zu kultiviren. Man muss nur die Uebertragungen so frühzeitig vornehmen, als die kleinen, aus einem Keime hervorgegangenen Colonien noch ganz isolirt und in Folge der Isolirung einheitlich und rein sind. Die Grenzen der Methode liegen darin, dass die Kartoffeln nicht allen Organismen günstige Existenzbedingungen bieten nnd darin, dass viele, sonst auf den Kartoffeln wachsende Organismen, nicht genügend augenfällig wachsen. Das letztere ist wichtig, weil man bei den festen undurchsichtigen Medien auf das blose Auge oder Loupenvergrösserung angewiesen ist.

Wichtiger sind die Uebertragungen auf Kartoffeln, wenn man sehen will, ob anderweitig gewonnene Reinkulturen, besonders von pathogenen Bakterien, die Fähigkeit haben auf pflanzlichen Substraten zu vegetiren. Man impft dann die sterilisirten Kartoffeln ebenso mit diesen Reinkulturen. Die Kartoffelscheiben können in derselben Weise in feuchten Glocken gehalten werden, die man verschiedenen Temperaturen aussetzt. Oder zur grösseren Sicherheit bringt man eine Kartoffelscheibe auf eine kleine Glasschale, welche man mit Hülfe eines rechtwinkelig gebogenen Messingstreifens auf den Boden eines cylindrischen Glasgefässes von ca. 18 cm Höhe und 6 cm Durchmesser niedersenkt. Der Glascylinder mit Glasschale und Messingstreifen war vorher mit einem Wattepfropf verschlossen und im Trockenschrank sterilisirt worden.

Statt der Kartoffelscheiben, welche durch ihre gelblichweise Farbe den Vorzug vor andern Wurzeln, wie Mohrrüben etc., verdienen, kann man auch zerriebene Kartoffeln verwenden. Zu diesem Zwecke bringt man die zerriebenen gekochten Kartoffeln in Kölbchen (am besten sogenannte Erlenmeyer'sche Kölbchen), fügt so viel Wasser zu, dass ein dicker Brei entsteht, und sterilisirt diesen Kartoffelbrei im Dampfapparat. Unter schnellem Oeffnen des Pfropfens

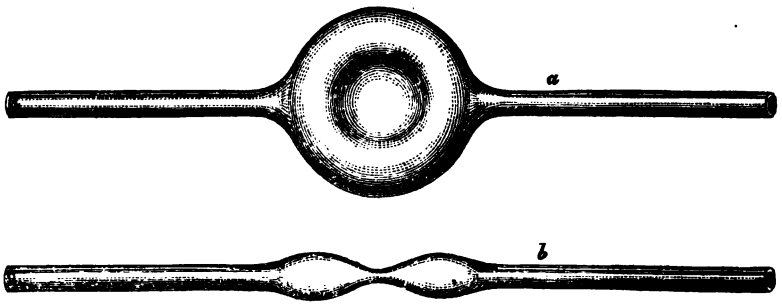
erfolgt die Impfung mit einer Platinnadel. Diesen Kartoffelbrei kann man durch Zusatz von Stärke, Zucker, Pepton, Fleischextract zu einem sehr guten Nährboden für viele Bakterien machen und dann sehr vortheilhaft benutzen um reine Massenkulturen bestimmter Bakterienarten zu gewinnen.

## 4. Die Gelatinekulturen von Klebs und Brefeld; Ausgang von einem Keime; feuchte Kammern.

Als Klebs l. c. versuchte einen Kokkus unter dem Mikroskope zu fixiren, um seine Theilung direct zu beobachten und so die ganze Reinkultur auf einen einzigen Keim zurückzuführen, gelang ihm dies in Flüssigkeitstropfen nicht, einerseits wegen der Bewegung, welche in dem Tropfen sich einstellte und dann, weil bei Luftzutritt die Concentration der Flüssigkeit durch Verdunstung sich änderte, wodurch der Werth der Flüssigkeit als Nährsubstrat alterirt wurde. Um die Verdunstung der Flüssigkeit aufzuheben oder doch zu beschränken und die Bewegungen zu verhindern, wandte Klebs statt der gewöhnlichen Nährlösungen als Kulturboden gekochte Hausenblase an, welche beim Abkühlen erstarrte.

Um nun weiter einen einzelnen, der in der Hausenblase befindlichen Kokken zu fixiren, bediente sich Klebs der v. Recklinghausen-Geissler'schen Kammern. Bei diesen, Fig. 10, führt

Fig. 10.

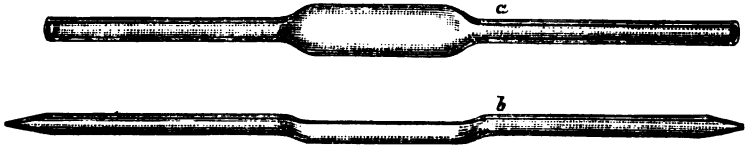



ein Zu- und Ableitungsrohr zu einem mittleren Raume aus deckglasdickem Glase, dessen Ober- und Unterseite sich in der Mitte fast berühren, so dass hier ein kleiner capillarer Raum vorhanden ist.

Saugt man diese Kammer voll Wasser, Nährflüssigkeit oder verflüssigte Gelatine, so bleibt, wenn man diese Lösungen wieder ausfliessen lässt, in den mittleren Verengerungen ein capillarer Tropfen hängen. Enthielten diese Lösungen gleichzeitig Keime und zwar soviel, dass jeder Tropfen ungefähr einen Keim führte, so wird in vielen Fällen auch der hängengebliebene Tropfen einen Keim enthalten, den man mit starken Trockensystemen leidlich fixiren und beobachten kann. Klebs füllte nun bald die ganze Kammer mit Gelatine oder Hausenblase, wodurch der Luftzutritt zu dem centralen Theile verhindert wurde, bald liess er nur den einen Tropfen in der Kammer, sorgte aber dann dafür, dass die Luft durch Baumwolle filtrirt zutrat.

In andern Fällen wandte Klebs statt der Kammer mit capillarem Raum, eine solche an, deren Wände parallel verliefen, und bei denen die Seitenröhren sich etwas unterhalb der oberen Wand ansetzten. Diese Kammern, der Beschreibung nach den von mir benutzten ähnlich, b in Fig. 11, füllte er nun (l. c. S. 46), durch

Fig. 11.




Ablaufenlassen der überschüssigen, flüssigen Gelatine derart, „dass eine dünne Schicht die abwärts gekehrte, zur mikroskopischen Untersuchung bestimmte Wandung bedeckte.“ Etwaige in dieser Schicht fixirten Keime kann man mit starken Trockensystemen und schwächeren Immersionssystemen fixiren und ihre Entwicklung direct beobachten. Statt der Luft kann man auch verschiedene Gase zutreten lassen.

Brefeld[1]) suchte sich, zunächst für Pilze, ein ganz reines Ausgangsmaterial zu verschaffen, um, von einem einzigen Keime

[1]) a. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, Bd. I.. 1872, S, 10,
b. Methoden zur Untersuchung der Pilze. Verhandl. der physik. med. Gesellschaft in Würzburg. N. F. VIII. Bd. 1874/75, S. 43.
c. Kulturmethoden zur Untersuchung der Pilze. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Bd. IV. 1881, S. 1.

ausgehend, die ganze Entwicklung eines Pilzes lückenlos zu verfolgen. Diese Ermittlungen übertrug Pasteur bald auf die Hefe[1]), und Brefeld weit später, ausführlich erst 1881, auch auf die Bakterien, und erwies ihre Brauchbarkeit durch die Entwicklungsgeschichte des bacillus subtilis. „Durch Mischen der Keime mit Wasser (l. c. c 1881, S. 12) bis zu einem Grade, dass in einer bestimmten Menge meist kein einziger, oder auch nur ein einziger Keim vorhanden ist, lässt sich die Trennung in einzelne Keime bis zu den kleinsten Formen ohne eine directe Beobachtung empirisch durchführen." „Es setzt diese Methode der Trennung eine vollkommen gleichmässige Vertheilung der einzelnen Keime in der Flüssigkeit voraus. Diese ist nicht immer leicht zu erreichen, und so können sich, wenn man nicht sehr vorsichtig und kritisch zu Werke geht, leicht mehrere und damit fremde Keime in die Kulturen einschleichen." Brefeld verdünnte die Sporen oder Keime enthaltende Flüssigkeit empirisch mit Wasser oder Nährflüssigkeit (l. c. b S. 49), „bis ein mit einer spitzen Nadel herausgenommenes und auf den Objectträger übertragenes Tröpfchen, mit dem Mikroskope besehen, nur eine oder zwei Sporen aufweist." „Der Objectträger mit der einen auf ihn übertragenen Spore dient als Unterlage für die Kultur, die hiernach das Prädicat Objectträgerkultur zur Unterscheidung von anderen Kulturformen bekommen hat."

Wenn man nun zu dieser einen Spore einen Tropfen Nährflüssigkeit zusetzte, so wurde die lückenlose Entwicklung durch zwei Momente erschwert, indem einmal der Kulturtropfen verdunstete und durch diese Aenderung der Concentration in seinem Werthe als Nährflüssigkeit herabgesetzt wurde, und indem andererseits fremde Keime eindringen konnten. Es galt demnach, die Verdunstung des Kulturtropfens zu verhindern und die Kultur für die Dauer der Beobachtung nach Aussen abzuschliessen. „Es ist dies (l. c. b S. 52) in zweifacher Weise möglich, einmal durch Veränderung der Kulturlösung, das anderemal durch Anwendung besonderer Objectträger."

---

[1]) Étude sur la bière. Compt. rend. 1873, S. 77.

„Um die Verdunstung zu verhindern (l. c. c S. 15), kann man die Nährlösungen mit Caraghen oder Gelatine in der Art versetzen, dass sie, bei 30—35 Grad noch flüssig, bis 15 Grad abgekühlt, fest werden. In diesen gelatinirten Lösungen wachsen die Pilze wie in dünner Flüssigkeit, ihre Entwicklung ist eher begünstigt, als geschädigt. Man kann die Kultur ohne Gefahr umdrehen, um zu verhindern, dass fremde Keime einfallen; und wenn man sie auf Deckgläsern ausführt, kann man sie umgekehrt auch mit starken Vergrösserungen besehen.“ Diese umgekehrten Objectträger bringt man in eine feuchte Glocke, Fig. 9, S. 80, auf ein Gestell aus Glas oder Zinkblech.

„Will man die gelatinirten Nährlösungen vermeiden (l. c. c S. 15), dann muss man zu besonderen Objectträgern seine Zuflucht nehmen, in welchen die Verdunstung der Nährlösungen und die Invasion fremder Keime unmöglich ist, ohne dass dadurch die Möglichkeit einer continuirlichen Beobachtung im mindesten beeinträchtigt wird.“

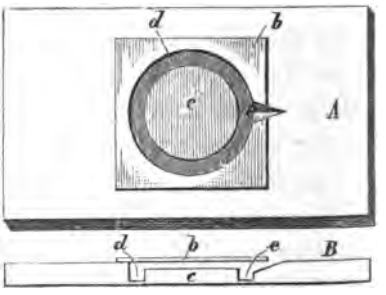
Zur Beobachtung im hängenden Tropfen dienen die in Fig. 6 und 7 abgebildeten Objectträger. Das Deckgläschen wird durch concentrirte Mineralsäure, Alkohol und Aether gründlich gereinigt, kurz vor dem Gebrauche durch die Flamme gezogen und gegen Staub geschützt, abgekühlt. Dann bringt man einen kleinen flachen Tropfen sterilisirter Nährlösung mit geglühter Platinöse auf die Mitte, impft diesen Tropfen, indem man mit der Platinnadel aus einer Reinkultur eine Spur einträgt, dreht das Deckglas um, legt es über den hohlen Objectträger und zieht zur Vermeidung der Verdunstung einen Rand von Vaseline um das Deckglas.

Statt den Tropfen am Deckglase zu impfen, kann man auch eine sterilisirte Nährlösung in einem Reagirglase mit der Reinkultur impfen, und zwar in dem Grade, dass nach gründlichem Vermischen durch Schütteln eine gleich grosse Probe, als Deckglastrocken-Präparat geprüft, ein bis zwei Keime ergiebt. Man entnimmt dann hiervon einen Tropfen, den man in derselben Weise am Deckglase befestigt. Brefeld (l. c. c S. 16) verwirft diese Methode: „Der Kulturtropfen kann nur klein genommen werden, sonst läuft er zum Tropfen zusammen, er schwankt bei der geringsten Bewegung, die

Keimspore verändert ihre Lage und ist mit starken Vergrösserungen kaum zugänglich; kurz, die Beobachtung ist mühsam und unvollkommen, auch dann, wenn man gelatinirte Nährlösungen anwendet.'

Mit den oben geschilderten Vorsichtsmaassregeln lässt sich nach vielen hierauf gerichteten Beobachtungen der hängende Tropfen mit grossem Erfolge verwenden, selbst für die kleinsten Formen der Kokken, sowohl als Flüssigkeitstropfen, wie als gelatinirter Tropfen, um zu sehen, ob eine Bakteriencolonie, welche sich einheitlich bei schwachen Vergrösserungen repräsentirt, aus einem einzigen Keime hervorgeht. Dieses Factum ist in vorzüglicher Weise für Hefecolonien von Hansen[1]) ermittelt durch Verwendung gelatinirter, hängender Tropfen, welche gegen Verdunstung geschützt waren. Eine Möglichkeit, diesen bei einiger Uebung so bequem zu handhabenden, auch den schwächeren Systemen für homogene Immersion zugänglichen Tropfen für das Studium der einzelnen Phasen der Entwicklung der Bakterien von Spore zu Spore besser als früher zu benutzen, dürfte darin gegeben sein, dass man Parallelversuche mit der Sporenfärbung macht, welche die einzelnen Phasen zu fixiren gestattet, so dass Bienstock[2]) die Sporenfärbung geradezu statt der directen Beobachtung anwandte, was mir allerdings zu weit gegangen scheint.

Fig. 12.




Prazmowski[3]) bediente sich, um Luftzutritt zu gestatten, der Objectträger, Fig. 12. Diese $2^1/_2$ mm dicken Objectträger tragen eine ringförmige Vertiefung d, e; die von diesem Ringe eingeschlossene Kreisfläche c ist sorgfältig glattgeschliffen und ihr Niveau liegt etwas tiefer (für Bakterien am besten nur 0,5 mm) als die Fläche

[1]) Ueber das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik. Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1884, Bd. I, S. 191.

[2]) Zeitschrift für klin. Med. 1884, S. 1.

[3]) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten 1880, S. 10.

des Objectträgers, so dass nach Auflegen des Deckglases b zwischen c und b eine dünne Flüssigkeitsschicht Platz hat. Die ringförmige Vertiefung verläuft bei e in eine kleine Rinne. Man bringt dann auf die Kreisfläche c einen Tropfen der sterilisirten Lösung, welche geimpft wird, oder einen eine annähernd bestimmte Zahl von Bakterien oder Sporen enthaltenden Tropfen, legt dann das vorher durch die Flamme gezogene Deckglas b auf, umrandet es mit Vaseline oder Wachs, so dass, um zu starke Verdunstung zu verhindern, nur bei der Rinne e Luft eintreten kann, welche von der ganzen Rinne her Zutritt findet zu der zwischen c und b eingeschlossenen Flüssigkeitsschicht. Diese letztere ist in ihrer ganzen Tiefe für starke Trockensysteme und schwache Immersionssysteme zugänglich.

Brefeld wählte um einen Keim zu fixiren erst, wie Klebs, die von Recklinghausen-Geissler'schen Kammern, Fig. 10. Aber (l. c. c 1881, S. 17) „der capillare Tropfen ist nach seiner Ansicht für die kleineren Formen zu tief, die Masse der Flüssigkeit zu gross, daher kommen die Bewegungen bei den geringsten Einflüssen, die gar nicht zu vermeiden sind, während man beobachtet, die aber schon ausreichen, eine Verschiebung des eingestellten Keims zu veranlassen. Die Keime müssen fixirt werden, indem man die Menge der umgebenden Nährlösung so reducirt, dass die Bewegungen minimale werden, dass aber die Menge der umgebenden Nährlösung doch ausreicht für den Keim, um seine volle Entwicklung zurückzulegen. Dies erreicht man nur in dünnen Flüssigkeitsüberzügen. Um sie auf der Innenwand der Kammer herzustellen, so dass die stärksten Linsen heranreichen, muss man andere kleine Kammern anwenden, die keinen capillaren Raum haben, die von dem dünnsten Glase in Deckglasdicke gemacht, so flach auf beiden Seiten sind, dass innen ein gleichmässiger Ueberzug entsteht, und dass auf der glatten, gleichmässig dicken Fläche die Fixirung eines Keimes mit starken Trockensystemen tagelang ohne Störung möglich wird. Es ist rathsam, den Kammerraum nicht grösser zu machen, als es nach der technischen Herstellung der Kammer eben nöthig ist. Man saugt die reinen Kammern voll, lässt ausfliessen und stellt die einzelnen auf den Innenwänden in dem dünnen Ueberzuge von Nährlösung haften gebliebenen Keime ein. Die Menge der Keime, die

man den Nährlösungen zumischt, kann hier weit zahlreicher sein; es bedarf keiner vorherigen Probe ihre Menge zu bestimmen, ebensowenig bedarf es langen Suchens, sie auf den Wänden zu finden. Es gelang mir so, ohne alle Mühe, die Keime von bacillus und von anderen Bakterien für unbegrenzte Zeit zu beobachten und hier geschlossene Entwicklungsreihen herzustellen, wie bei grösseren Pilzen. Dabei ist es auf das leichteste möglich, die Zeitdauer zu ermitteln, welche für die Wachsthums- und Theilungsvorgänge und schliesslich für den Kreislauf der Entwicklung von Spore zu Spore nöthig ist.

Die Anwendbarkeit dieser Kammern für die Untersuchung der Spaltpilze reicht bis zu den kleinsten Formen hinab, die überhaupt noch mit den stärksten Trockensystemen der Beobachtung zugänglich sind."

Brefeld bediente sich Kammern der Form a, Fig. 11, welche Geissler herstellt. Ich bediene mich der Form b, gleichfalls von Geissler hergestellt. Nach meinen Versuchen gelingt es in der That derartig dünne Ueberzüge von Flüssigkeit herzustellen, wenn die Kammern durch Mineralsäure, Alkohol, Aether, Hitze aufs sorgfältigste gereinigt und sterilisirt sind. Mit grossem Vortheil kann man, wie Klebs schon 1873 mit ähnlichen Kammern es machte, eine dünne Gelatineschicht herstellen. Ich habe in solchen Gelatineschichten die Bildung von Colonien, welche mit blossem Auge sichtbar wurden, für einzelne Formen von einem Keime aus verfolgt. Bei der von mir gewählten Form konnte ich homogene Immersion $^1/_{12}$ mit schwachem Ocular verwenden. Bei allen diesen Kammern bedarf man in der Regel eines der gebräuchlichen heizbaren Objecttische.

Für die lückenlose Ermittelung des Kreislaufs von Spore zu Spore dürften diese Kammern mit parallelen Wänden zur Zeit wohl das meiste leisten. Für orientirende Versuche ziehe ich aber die weit bequemeren Beobachtungen im hängenden Tropfen vor.

### 5. Verdünnungs-Methode.

Nachdem Brefeld mit positivem Erfolge für Schimmelpilze, Pasteur für Hefe gezeigt hatte, dass man durch systematische Verdünnung der Mikroorganismen resp. Sporen haltigen Lösung es

dahin bringen kann, dass in einer bestimmten Flüssigkeitseinheit annähernd ein Keim vorhanden ist, von dem man bei Experimenten, bei Uebertragungen in sterilisirten Medien ausgehen kann, negirte Nägeli[1]) trotz aller vorausgegangenen Versuche die Möglichkeit bei Bakterien Reinkulturen zu gewinnen. „Spaltpilze gestatten mit Sicherheit keine Reinkultur, theils wegen ihrer ausserordentlichen Kleinheit, theils wegen ihrer allgemeinen Verbreitung im Wasser und in der Luft." Nicht um solche, nach seiner damaligen Mittheilung ganz aussichtslose Versuche zu Reinkulturen zu machen, sondern um die „Vermehrungsfähigkeit der Spaltpilze" nach der Intensität der Veränderung des Substrats zu prüfen, gab damals Nägeli eine Verdünnungsmethode an, indem er eine bestimmte Menge Schizomyceten haltige Flüssigkeit mit bestimmten Mengen sterilisirtem Wasser verdünnte. Nach Darlegung einer interessanten Gleichung mit lauter unbekannten Grössen kam Nägeli selbst (l. c. S. 646) zu dem Schlusse: „Die Auflösung dieser Gleichung kann nur durch Probiren geschehen." In den Untersuchungen über niedere Pilze[2]) führt Nägeli einen solchen empirischen Versuch von 1871 an, nachdem 1877 die Möglichkeit der Reinkulturen geleugnet war, indem er faulen Harn so stark mit Wasser verdünnte, dass je zwei Tropfen einen Bakterienkeim enthielten; durch Uebertragen je eines Tropfens in ein Glas mit sterilisirter Lösung gelang ihm damals eine sichere Trennung von Stäbchen und Kokken.

Ich finde in Nägeli's Untersuchungen leider keinen Anhalt, um diese später mitgetheilten positiven Resultate von 1871 mit seiner vollständigen Negation von 1877 und seinen theoretischen Anschauungen über die Morphologie der Bakterien und die Zusammensetzung aller Bakterien aus Kokken in Einklang zu bringen. Sicher ohne jede Kenntniss dieses Versuches von Nägeli vom Jahre 1871 theilte Lister[3]) 1878 mit, dass er saure Milch so verdünnt habe, dass ein Tropfen einen Keim enthalten sollte. Impft er nun steri-

---

[1]) Nägeli und Schwendener: Das Mikroskop. 2. Aufl. 1877, S. 644.

[2]) 1882, S. 13.

[3]) On the lactic fermentation and its bearings on pathology. Transactions of the Pathological Sociéty of London 1878. Bd. XXIX.

lisirte Milch mit 2 bis 4 Tropfen der Verdünnung, so erhielt er regelmässig Säuerung und Gerinnung, weniger sicher, wenn er von einem Tropfen ausging, weil in letzterem Falle wohl nicht jeder Tropfen auch wirklich einen Keim enthalten hatte.

Fitz[1]) bediente sich bei seinen Gährungsversuchen gleichfalls der Verdünnungsmethode, die er allein als die „Ein-Zell-Kultur" gelten lässt: „Um eine Reinkultur eines gährungserregenden Spaltpilzes zu gewinnen, ist es unbedingt nothwendig, von einer einzigen Zelle als Aussaat auszugehen." „Man bestimmt in einer gewöhnlichen, noch unreinen Kultur mit Hülfe einer Zählkammer annähernd die Zahl der Spaltpilzzellen, die in einem Tropfen enthalten sind, und verdünnt dann einen Tropfen so stark mit sterilisirtem, destillirtem Wasser, dass im Durchschnitt auf 5 bis 10 Tropfen der verdünnten, gut gemischten Flüssigkeit eine Spaltpilzzelle kommt. Man sät dann in einer Serie von ca. 50 mit Kulturflüssigkeit beschickten und sterilisirten Kölbchen je einen Tropfen aus und setzt sie alsdann in ein Thermostrat von 37°. Von den 50 Kölbchen werden im Laufe der nächsten drei Wochen 5 bis 10 Kölbchen Pilzentwicklung zeigen. In einem jeden dieser Kölbchen wird die Pilzkultur unter sich einheitlich und rein sein, weil sie von einer einzigen Zelle abstammt. Man erhält so die verschiedenen Spaltpilze, die in der ursprünglichen unreinen Kultur enthalten waren, jeden für sich isolirt."

Für pathogene Bakterien, speciell für Milzbrandbacillen, verwandte Buchner[2]) die Verdünnungsmethode, indem er Milzpulpa zerrieb und mit sterilisirtem Wasser so stark verdünnte, dass auf ca. 10 ccm eine einzige Bakterie kam. Mit solchen, einen Keim enthaltenden 10 ccm wurden dann die sterilisirten Nährlösungen inficirt.

Aehnlich verfuhr Hansen[3]), indem er für Hefe die Verdünnung so weit trieb, dass erst 2 ccm eine Zelle enthielten.

---

[1]) Ueber Spaltpilzgährungen. VII. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. XV. Bd. 1882, S. 867.

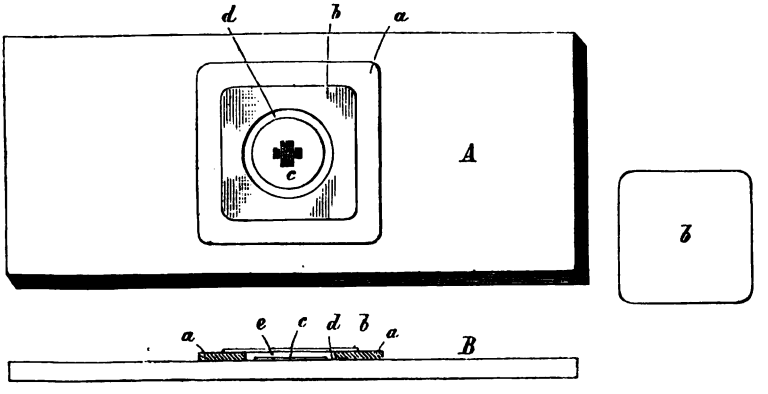
[2]) Ueber die experimentelle Erzeugung des Milzbrandcontagiums aus den Heupilzen. Untersuchungen über niedere Pilze von Nägeli 1882, S. 147.

[3]) Ueber das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik. Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie. I. Bd. 1884, S. 191.

Zur Zählung der Anzahl der Keime in der ursprünglichen Flüssigkeit sowohl, als in den verdünnten Lösungen, bringt man eine bestimmte Menge in einen Blutkörperchen-Zählapparat. Man kann hierzu die Kammer von Hayem-Nachet wählen. Dieselbe, Fig. 7, S. 27, besteht aus einem Objectträger A, B, auf dem eine mit kreisförmigem Ausschnitt c versehene Glasplatte b von ganz bestimmter Dicke, 0,2 mm, oder für Bakterien noch besser 0,1 mm Dicke, befestigt ist, wie sie Zeiss liefert. Durch Auflegen eines sehr sorgfaltig geschliffenen Deckglases d entsteht ein von parallelen Wänden eingeschlossener Raum, von genau 0,2 oder 0,1 mm Höhe, welcher eine ganz bestimmte Menge, eine Volumeneinheit, Flüssigkeit fasst. Die Zählung geschieht dann mit Hülfe eines Ocular-Netzmikrometers. Die Flüssigkeit muss den Raum genau füllen, das Deckglas berühren, ohne überzutreten.

Noch feineres Arbeiten gestattet die Modification, Fig. 13, welche von Thoma[1]) angegeben ist und von Zeiss ausgeführt wird.

Fig. 13.




Auf einen Objectträger A, B ist eine oben polirte Glasplatte a befestigt, deren kreisförmiger Ausschnitt d die seitliche Kammerwand bildet. In diesem Ausschnitte ist eine kreisförmige Glasplatte c

[1]) Abbé: Ueber Blutkörper-Zählung. Sitzungsberichte der Jenaischen Gesellsch. f. Med. u. Naturwissenschaft 1878, No. 29. — Lyon und Thoma: Ueber die Methode der Blutkörperzählung. Virchow's Archiv 1881. Bd. LXXXIV, S. 131.

aufgekittet, welche so stark ist, dass der Raum e zwischen ihr und dem aufgelegten Deckglase b, der eigentliche Zählraum, genau 0,1 mm beträgt; a und c sind sorgfältig parallel zur Oberfläche des Objectträgers geschliffen; ebenso muss die Deckplatte b so sorgfältig planparallel geschliffen und so gereinigt sein, dass sich bei Andrücken derselben an die polirte obere Fläche der Kammer Newton'sche Farbenringe bilden, welche bei Nachlassen des Druckes bestehen bleiben. Die Mischung geschieht mit einem, auch für die ersten Zählkammern zu verwendenden Mischgefäss. Da genaue Gebrauchsanweisung den Apparaten beigegeben wird, genügen diese Daten. Der Vortheil der Thoma'schen Kammer besteht darin, dass das Ocular-Mikrometer wegfällt, weil in die Platte c eine Gittertheilung, 1 qmm in 400 quadratische, gleichgrosse Felder, eingeritzt ist. Man braucht deshalb den absoluten Werth eines Theils, der sich bei jedem Objectiv und jeder Tubuslänge ändert, gar nicht zu kennen, wie bei einem Ocularmikrometer.

Man mag aber die Zählung noch so genau, die Mischung noch so sorgfältig vorgenommen haben, eine absolute Sicherheit für den Ausgang von einem Keime giebt auch die Verdünnungsmethode als „Ein-Zell-Kultur" nicht. „Mängel haften; wie Hansen trotz seiner trefflichen Ermittelungen unumwunden zugiebt, auch dieser Methode an; namentlich ist es nicht sicher, ob die Anzahl Zellen, welche man im Voraus berechnet hat, sich wirklich im Kolben mit der fertigen Infectionsflüssigkeit befindet; es kann sogar vorkommen, dass nicht eine einzige Zelle hineingelangt ist, ferner auch, dass sich mehrere, als man gewünscht hatte, vorfinden."

Die Verdünnungsmethode kann auch in der besten Form dem theoretischen Postulate des Ausgangs von einem Keime nur bedingt gerecht werden. Will man weiter eine nur mässige Garantie haben dafür, dass die verschiedenen Arten von Bakterien, welche eine Mischung enthalten kann, durch die Verdünnungsmethode leidlich getrennt werden, so bedarf man ausserordentlich vieler Einzelversuche, welche von Fitz selbst für seinen ganz concreten Fall, auf 50 angegeben wurden, welche aber in die Hunderte und Tausende gehen müssten, wenn es sich um Faulflüssigkeiten oder stark ver-

unreinigtes Wasser, oder ähnliche Gemische mit vielen verschiedenen Bakterien handelt.

Ohne Eingeständniss dieses practischen Bedenkens, welches der Verdünnungsmethode viele Schranken zieht, haben deshalb alle Forscher, welche sich mit Erfolg der Verdünnungsmethode bedient haben, dafür gesorgt, ein schon möglichst reines, einheitliches Ausgangsmaterial durch Massenkulturen vorzubereiten unter Zuhülfenahme secundärer Momente, welche sich, nach Brefeld (l. c. c 1881, S. 12), „aus der abweichenden Lebensweise und aus anderen morphologischen und physiologischen Eigenthümlichkeiten der verschiedenen Formen herleiten lassen.“ Mit dieser Einschränkung ist die bis zur Ein-Zell-Kultur getriebene Verdünnung recht gut zu brauchen für einzelne pathogene Organismen, noch mehr für Fermentbakterien, deren Existenzbedingungen man schon annähernd kennt, oder aus der Art ihres spontanen Vorkommens vermuthet. Das durch die Reinkulturen erst zu beweisende, die Biologie der Bakterien, wird in diesen Fällen demnach provisorisch als schon bekannt vorausgesetzt.

Man wählt Nährflüssigkeiten, von welchen man bestimmt weiss, oder vermuthet, dass sie die supponirte Gährung eingehen können, impft dieselben mit einer Spur oder einem Tropfen des noch unreinen Ausgangsmaterials, bringt diese so geimpften Kölbchen in höhere oder niedere Temperatur, überträgt nach eingetretener Entwicklung ein zweites Mal, bis man eine leidliche Reinkultur eines Organismus hat, wie bei den Methoden 1 und 2.

Andere solcher Kölbchen hält man unter Luftabschluss, wenn man vermuthet, dass die betreffende Fermentation besser bei Beschränkung oder Abschluss von Luftsauerstoff vor sich geht[1]), wie bei den Experimenten über Anaerobiose noch genauer dargelegt wird. Nach einigen derartigen Uebertragungen nimmt man die Zählung und Verdünnung vor, und dann die Impfung sterilisirter Nährlösungen mit den Volumeneinheiten mit je einem supponirten Keime.

---

1) Fitz: Ueber Spaltpilzgährungen. IX. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1884. Bd. XVII, S. 1188.

Unter diesen Massenkulturen bedarf

***die Erhitzungsmethode,***

wie ich sie kurz nennen möchte, einer genaueren Besprechung.

In allen Fällen, in denen nach kürzerem oder längerem Einwirken der Siedehitze oder einer dieselbe noch übersteigenden Temperatur in Flüssigkeiten später Bakterienvegetation eintrat, ermittelte Cohn[1]) zuerst, dass es sich immer um Sporen bildende Bakterien handelte, deren Sporen auf kürzere oder längere Zeit den hohen Temperaturen widerstanden. Miquel[2]) isolirte einen Ammoniak bildenden „bacillus ureae" aus Abwässern, in denen seine Sporen vorhanden waren, dadurch, dass er Gläser mit diesem sporenhaltigen Wasser auf 108° erhitzte. Brefeld[3]) fand, dass zur Vernichtung der Sporen des bacillus subtilis nöthig waren, dreistündiges Kochen bei Siedetemperatur, oder eine Wärme des Oelbades von 105° $^1/_4$ Stunde, von 107° 10 Minuten, von 110° 5 Minuten. Durch Abkürzung dieser Zeit kann man diese Bacillen rein von allen weniger widerstandsfähigen erhalten. Prazmowski[4]) bediente sich zur Erzielung und Erhaltung von Reinkulturen der sporenbildenden Bacillen und Clostridien des kürzeren oder längeren Aufkochens der sporenhaltigen Flüssigkeiten. Ohne Rücksicht auf diese Ermittlungen hat dann Gunning[5]), ausgehend von einer missverständlichen Auffassung der Methode der durchsichtigen festen Nährmedien, vorgeschlagen die höheren Temperaturen systematisch zu verwenden zur Isolirung der verschiedenen Bakterien. Gunning selbst isolirte dabei allerdings, wie alle vor ihm, eine sporenbildende Art.

Bei systematischer Prüfung dieser Methode durch Verwendung von sporenfreien und sporenhaltigen Reinculturen verschiedener Bak-

---

[1]) Untersuchungen über Bakterien, Bd. IV; die Bakterien und die Urzeugung. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. II. Bd., Heft 2, 1876, S. 249. Vergl. auch die Literatur im ersten Abschnitt und über Sporenfärbung.

[2]) Bulletin de la société chimique de Paris 1879. Bd. XXXII, S. 127.

[3]) Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, Bd. IV, 1881, S. 51.

[4]) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten 1880, S. 8.

[5]) Beiträge zur hygienischen Untersuchung des Wassers. Archiv für Hygiene, I. Bd., 1883, S. 335.

terienarten ermittelte ich, was allerdings für jeden mit der Biologie der Bakterien Vertrauten vorauszusehen war, dass man auch durch systematisches Erhitzen unterhalb, bei und oberhalb der Siedetemperatur immer nur die widerstandsfähigeren von den weniger resistenten trennen kann, derart, dass sich für practische Zwecke ausschliesslich die Trennung sporenhaltiger Bakterien von sporenfreien empfiehlt. Sind zwei annähernd resistente Sporenarten vorhanden, so ist durch kürzeres oder längeres Erhitzen allein eine genügende Trennung nicht zu erreichen. Das Verfahren, durch Erhitzen leidliche oder ganz reine Massenkulturen zu gewinnen, ist, wie ich schon früher[1]) angab, auf bestimmte Fälle beschränkt, aber für diese auch so gut brauchbar, dass es zur Trennung sporenhaltiger von sporenfreien Bakterien wohl die beste Methode zur Gewinnung von vorbereitenden Massenkulturen, oft selbst von wirklichen Reinkulturen ist.

## 6. Kulturen in Haarröhrchen nach Salomonsen.

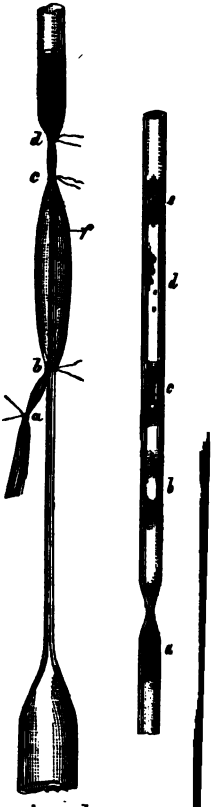
Bei der spontanen Veränderung des Blutes durch Fäulniss beobachtete Salomonsen[2]), dass sich im Blute schwarze „Fäulnissflecke" durch Reduction des Oxyhämoglobin bilden, welche am Boden kreisrund und scharf contourirt, nach obenzu mehr keulenförmig sind, die sich allmählich vergrössern, berühren und dann eine diffuse dunklere Färbung der ganzen Blutmasse hervorrufen. So lange diese Flecke noch isolirt sind, besteht jeder solcher Fleck nach Salomonsen aus einer einzigen Bakterienart, welche durch ihre Vegetation die Farbenveränderung des Blutes bewirkt. Jeder solcher Fleck ist eine Colonie, eine ächte Reinkultur einer einzigen Art. Saugt man nun frisches oder difibrinirtes Blut in Haarröhrchen ein, so entstehen in dem Blute in diesen Röhrchen gleichfalls derartige isolirte Fäulnissflecke. Statt wirklicher Capillar-

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, II. Bd., 1884, S. 330.

[2]) Zur Isolation differenter Bakterienformen. Botanische Zeitung 1876, No. 39; Studier over Blodets Forraadnelse 1877; Eine einfache Methode zur Reinkultur verschiedener Fäulnissbakterien. Botanische Zeitung 1880, No. 28.

röhren, Lymphröhrchen, kann man auch feine Glasröhren verwenden, welche an einem Ende zur Capillare ausgezogen werden, Fig. 14. Unter den so entwickelten Colonien bemerkt man mit schwächeren Vergrösserungen, z. B. mit der Loupe, kleine Differenzen in der Grösse, der Schnelligkeit des Wachsthums und in den Formen (b, c, d, e, der 2. Abbildung von Figur 14). Jede solche kleine Differenz ist ein sichtbares Zeichen, dass derartige differente Colonien verschiedenen Bakterienformen ihren Ursprung verdanken. Will man nun eine solche Reinkultur zu Uebertragungen verwenden, so bricht man das Röhrchen in der Nähe durch, taucht eine vorher geglühte Platinnadel ein und überträgt unter schnellem Oeffnen in eine sterilisirte Lösung.

Fig. 14.




Die Röhrchen erhalten an einem Ende vortheilhaft eine kleine Verengerung oder Knickung, bei welcher (a) Baumwolle oder Asbest eingepresst wird, während das zur Capillare ausgezogene Ende zugeschmolzen ist; das so vorbereitete Röhrchen wird durch Hitze sterilisirt. Das zugeschmolzene Ende wird erst in der Flüssigkeit abgebrochen, durch Saugen an dem mit Watte verschlossenen Ende gefüllt, nach dem Herausnehmenmit Alkohol gereinigt, und dann am capillaren Ende von Neuem zugeschmolzen oder mit einem Lack verschlossen.

Aehnlich ist das Entstehen von isolirten Fäulnissflecken, oder überhaupt von Bakterien-Colonien in Substanzen, welche spontan, wie das Blut durch die Bildung der Cruorschicht, fest werden oder gelatiniren, während in wirklichen Lösungen eine solch scharfe Isolirung auch in Haarröhrchen nicht eintritt. Mit Berücksichtigung dieses, damals von Salomonsen noch nicht vollständig erkannten Punktes war diese Methdoe bis vor wenigen Jahren eine der zuverlässigsten, um wirkliche Reinkulturen zu erzielen.

Entnimmt man Blut von gesunden Thieren, ohne dass mit dem

Blute Luft zutreten konnte, direct den Gefässen, so entstehen niemals solche Fäulnissflecke. Man verfährt nach Salomonsen in der Art, Abbildung 1, Fig. 14, dass man das ausgezogene, zugeschmolzene Ende einer sterilisirten Glasröhre in das unter antiseptischen Cautelen blosgelegte und geöffnete Gefäss einbringt und, nachdem erst etwas Blut neben der Röhre ausgeflossen ist, bei b auf die Röhre festbindet. Dann zerbricht man bei f das ausgezogene Ende innerhalb des Gefässes und füllt durch Saugen am entgegengesetzten Ende, welches durch sterilisirte Watte oder Asbest geschlossen ist, die Röhre mit Blut. Darauf legt man die Ligaturen a, c und d, schneidet zwischen a und b, und zwischen c und d durch und schmilzt an der Flamme unterhalb b zu. An dieser Seite konnte zu keiner Zeit des Füllens Luft zutreten, und an der andern Seite kann nur filtrirte Luft zutreten. Die Röhrchen kommen dann in Thermostate bei Bluttemperatur.

Die Glasröhrchen werden, wie ich gefunden habe, am sichersten, ehe sie die definitive Gestalt erhalten, erst mit Sublimatlösung 1 p. M. desinficirt, das Sublimat mit Alkohol entfernt, der Alkohol mit Aether aufgenommen und dieser durch Erwärmen verdunstet. Dann wird das eine Ende ausgezogen und zugeschmolzen, das andere Ende erhält eine leichte Verengerung oder Torsion, und wird bis zu dieser Stelle, wie a in der 2. Abbildung der Figur 14, mit Asbest oder Watte fest gefüllt. Diese so vorbereiteten Röhrchen werden bei 150 bis 160° 1 bis 2 Stunden endgültig sterilisirt und nach dem Abkühlen, unmittelbar vor der Operation, das einzuführende Ende noch einmal schnell durch die Flamme gezogen.

Zahn[1]) nahm statt solcher Glasröhren Pipetten von 50 bis 300 ccm Inhalt, deren einzuführendes Ende spitz ausgezogen und deren anderes Ende vorläufig an einer Stelle verjüngt wurde. Dann wurde der Ballon der Pipette auf dem Wasserbade oder in der freien Flamme stark erhitzt, während des Erhitzens vielfach die Luft noch ausserdem durch Sauerstoff, Kohlensäure oder Wasserstoff verdrängt, und während des Erhitzens und Durchleitens der

[1]) Untersuchungen über das Vorkommen von Fäulnisskeimen im Blut gesunder Thiere. Arch. f. pathol. Anatomie 1884, Bd. CXXXXV, S. 401.

Gase sowohl das ausgezogene Ende als die verjüngte Stelle zugeschmolzen. Das Sterilisiren geschah durch hohe Temperatur. Da die Luft in der Pipette durch das Erhitzen verdünnt war, erfolgte nach Abbrechen der Spitze im Gefässe die Füllung in Folge des negativen Druckes. Beim nachherigen Zuschmelzen können, nach Zahn, sich bisweilen feine Risse einstellen, worauf man sorgfältig zu achten hat. Ich überziehe diese Stellen unmittelbar nach dem Abschmelzen sofort mit einer Kuppe von Siegellack.

Stammt das Blut von gesunden Thieren, so trennt sich der Blutkuchen von dem Blutserum; auf dem letzteren bildet sich bisweilen ein feines Häutchen aus feinsten Fetttröpfchen und veränderten Blutplättchen. Die zelligen Elemente zerfallen allmählich einer regressiven Metamorphose, die Granulationen treten aus. Aber wirkliche Bakterien, selbst Kokken, treten nicht auf, und die Fäulnissflecke stellen sich nicht ein. Diese Blut-Granulationen sind sowohl direct als Bakterien aufgefasst, als auch als Bakterien durch Anamorphose des Protoplasma erklärt worden.

Enthielt das Blut Bakterien, wie bei vielen Infectionskrankheiten, so kann man dieselben in diesen Röhren als Reinkulturen erhalten.

## 7. Die Infections-Methode.

Bei dem höchsten, in der Einleitung als streng obligater Parasitismus bezeichneten Grade der Anpassung an die parasitische Lebensweise scheinen a priori nur die Gewebe des thierischen oder pflanzlichen Organismus den Parasiten die nöthigen Existenzbedingungen zu bieten, und in manchen extremen Fällen scheint nur eine ganz bestimmte Art, oder selbst nur eine bestimmte Varietät den Parasiten als Wirth dienen zu können. Derartige Beobachtungen führten dazu, gesunde Thiere und Pflanzen der für die Parasiten empfänglichen Arten künstlich mit denselben zu inficiren, so dass dann der künstlich inficirte Organismus diese Parasiten unter reinen Bedingungen enthielt. Ich erinnere nur an die bekannten Experimente über Trichinose, an die Infectionen von Pflanzen mit Pilzen von de Bary, van Tieghem und besonders von Brefeld, welcher die Aufgabe

der Infectionsmethode dahin präcisirte[1]), „erstens zu ermitteln wo und wie die Pilzkeime eindringen, dann zweitens die Entwicklung des Pilzes und das Fortschreiten der typischen Erkrankung der Wirthe von den eingedrungenen Pilzkeimen lückenlos herzuleiten."

Die sowohl durch klinische Beobachtungen, durch Thatsachen der Epidemiologie als vielfache Experimente festgestellte Uebertragbarkeit vieler Infectionskrankheiten führte dann, nachdem man manche dieser Krankheiten in Beziehungen zu Bakterien zu bringen gelernt hatte, dazu, die Infectionsmethode auch auf die Bakterien anzuwenden. Wir müssen strenggenommen hierbei zwei Dinge auseinanderhalten. Einmal die Uebertragung anderweitig gewonnener Reinkulturen auf Thiere zum Nachweise der malignen Eigenschaften dieser Bakterien, und zweitens die Uebertragungen von Thier zu Thier ohne anderweitig vorausgegangene Reinkulturen. Es wurden früher meist, aber oft selbst jetzt noch, zu solchen Infectionen beliebige Thierspecies verwendet, welche gerade im Laboratorium zur Hand waren. Da ermittelte Koch[2]), dass bei Uebertragung von Faulflüssigkeiten auf Feld- und Hausmäuse nur die letzteren an einer bestimmten, durch feine Bacillen bedingten Septikämie zu Grunde gingen, und dass nach einigen Uebertragungen von Maus zu Maus das Blut dieser letzteren eine tadellose Reinkultur dieser Bakterienart darstellte. Dasselbe ermittelte er für eine andere Bakterienart durch Uebertragung von anderen Faulflüssigkeiten auf Kaninchen; auch bei diesen waren nach wenigen Uebertragungen von Thier zu Thier alle übrigen, ursprünglich in der Flüssigkeit reichlich vorhandenen Bakterien eliminirt und das Blut bot eine Reinkultur einer einzigen Bakterienart. Milzbrandbacillen tödten Mäuse so absolut sicher, dass man durch Uebertragung von Bakteriengemengen, welche Milzbrandbacillen enthalten, auf Mäuse nach wenigen Uebertragungen diese Bakterien rein erhalten kann. Ferner gelang es Carter und Koch Affen mit Re-

[1]) Die künstliche Kultur parasitischer Pilze. Botanische Untersuchungen über Hefenpilze, Bd. V, 1883. S. 1.

[2]) Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten 1878. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 1.

currensblut zu inficiren, derart dass das Blut dieser Thiere Reinkulturen der Recurrens-Spirochäten repräsentirte.

Aus derartigen Ermittelungen leitete Koch das wichtige Postulat her, zu Infectionsversuchen zunächst solche Thierspecies zu verwenden, welche nachweislich empfänglich für die betreffende Krankheit sind, also Thiere derselben Art, und bei nicht Ausführbarkeit dieses Postulats zuerst Species zu wählen, welche der Thierart nahe stehen, bei der die Krankheit spontan auftritt. Die Technicismen folgen bei den Uebertragungsversuchen.

Diese Infectionsmethode als Methode der Reinkultur, bei der das Blut oder überhaupt der absichtlich inficirte Organismus eine Reinkultur der infectiösen Mikroorganismen darstellt, ist ins Auge zu fassen bei allen den Bakterien, welche den höchsten Grad der parasitischen Adaption zeigen, und bei allen den Infectionskrankheiten, bei denen Mikroorganismen bis jetzt noch nicht nachgewiesen sind, welche aber klinisch und epidemiologisch rein contagiös auftreten. Bei einzelnen dieser Krankheiten, bei vielen acuten Exanthemen, scheinen aber selbst derartige Uebertragungen ganz aussichtslos, weil diese Krankheiten möglicherweise ganz ausschliesslich den Menschen befallen, weil bei denselben die supponirten Mikroorganismen nur noch im menschlichen Körper die Existenzbedingungen finden. In solchen Fällen ist natürlich die Lösung aller in der Einleitung gestellten Fragen unmöglich, und es würde unbillig sein von der bakteriologischen Forschung hier die Lösung von Aufgaben zu verlangen, welche der Natur der Sache nach unlösbar sind.

In diesen Fällen müssen aber die lösbaren Theile der Aufgabe um so gewissenhafter ermittelt, die klinischen und epidemiologischen Beobachtungen um so kritischer gesichtet werden.

Aber der Bakteriologe darf erst verzichten auf die Lösung aller Aufgaben, wenn wirklich alle Möglichkeiten erschöpft sind. Eine Verbesserung der Methoden gestattet bisweilen scheinbar unmögliche Aufgaben noch lückenlos zu lösen, wie die glänzendste Leistung auf diesem Gebiete, Koch's Ermittelung der Aetiologie der Tuber-

kulose, lehrt, bei welcher das Experiment Reinkulturen herzustellen gestattete ausserhalb des thierischen Organismus trotz des scheinbar höchsten Grades parasitischer Adaption.

## 8. Die Kulturen auf durchsichtigem, festen Nährboden nach Koch.

Bis zur Mittheilung dieser Methode[1]) waren an Thatsachen ermittelt, welche zur Herstellung von Reinkulturen in bestimmten Fällen sich bewährt hatten:

1. Die Vortheile des festen, undurchsichtigen Nährbodens für die isolirte Kultur characteristischer Bakterien durch Schröter.
2. Die Möglichkeit des isolirten Wachsens von reinen Bakteriencolonien im Blute und die Möglichkeit der Differentialdiagnose solcher Colonien mit schwachen Vergrösserungen durch Salomonsen.
3. Die Vortheile durchsichtiger Medien für viele Fälle durch Pasteur, Cohn, Brefeld.
4. Das Prinzip des Ausganges von einem Keime durch Brefeld, Pasteur, Lister, Nägeli, Fitz.
5. Bei Anwendung dieses Princips die Nothwendigkeit der örtlichen Trennung, um jedem solchen einzelnen Keime die Möglichkeit zu geben, isolirt und rein sich zu vermehren.
6. Die Einführung der Gelatine durch Klebs und Brefeld, um die Verdunstung von Nährflüssigkeiten aufzuheben.

Diese Vortheile waren bis zu Koch immer nur isolirt zur Anwendung gekommen. Das verbindende Glied, welches gestattet, die meisten dieser Vortheile derart zu vereinigen, dass durch diese Verbindung die universellste und zugleich einfachste aller Methoden resultirte, fand aber erst Koch.

[1]) Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 1.

Auf festem Nährboden wachsen durch absichtliche oder Luftinfection hinaufgelangte Keime, wie früher schon geschildert, zunächst isolirt zu einer Colonie aus. Ist dieser feste Nährboden undurchsichtig, so gelingt eine genügende Beobachtung nur bei besonders characteristisch wachsenden Mikroorganismen, wie es z. B. die Pigmentbakterien sind. Ist aber der Nährboden nicht nur fest, sondern gleichzeitig durchsichtig, so kann man mit Hülfe schwacher Vergrösserungen auch Colonien unterscheiden durch Eigenthümlichkeiten des Wachsthums, welche für das blosse Auge oder Loupenvergrösserung nicht mehr deutlich wahrnehmbar sind. Koch vereinigte die Vortheile des festen Nährbodens zur Trennung differenter Keime mit den Vortheilen, welche der durchsichtige Nährboden zur directen mikroskopischen Beobachtung bietet. Diese gleichzeitige Betonung der Festigkeit und Durchsichtigkeit unterscheidet Koch's Methode von allen anderen Methoden.

Koch schlug zur Erreichung dieses Zieles zwei ganz verschiedene Wege ein, indem er einmal feste durchsichtige Nährmedien wählte, welche ohne jeden Zusatz diesem Postulat gerecht wurden, und zweitens, indem er gewöhnliche klare Nährlösungen durch gelatinirende Zusätze zum Erstarren brachte.

Diese letzteren, welche zur Auffindung des Princips der Festigkeit und Durchsichtigkeit führten, und zeitlich dem anderen Wege vorangingen, gewann Koch dadurch, dass er zu den früher bekannten Normal-Nährlösungen und zu bewährten Decocten und Infusen so viel Gelatine zusetzte, dass diese Lösungen bei Zimmertemperatur zu einem durchsichtigen festen Nährboden erstarrten. Impfte Koch nun in eine solche „Nährgelatine", so lange sie noch flüssig war, von einer bakterienhaltigen Flüssigkeit eine Spur, so wurden beim Erstarren die einzelnen Keime jeder für sich von einer Gelatineschicht umhüllt. Waren nicht zu viele Keime hineingeimpft worden, so blieben sie in Folge des Festwerdens der Gelatine genügend getrennt, so dass jeder Keim am Orte der Fixirung isolirt zu einer Colonie heranwachsen konnte. Liess man die gelatinirte Lösung auf einer durchsichtigen Glasplatte erstarren, so konnte man

diese Entwicklung der Colonien aus den einzelnen Keimen mit dem Mikroskope schon zu einer Zeit direct beobachten, in der die Loupe oder das blosse Auge noch keinerlei Entwicklung erkennen liess.

Die gelatinirenden Zusätze dienten bei Koch nicht, wie bei Klebs und Brefeld, zur Verhütung der Verdunstung; die bessere Nährfähigkeit war nicht, wie Brefeld betonte, eine erwünschte, sondern oft geradezu eine unerwünschte, mindestens eine höchst gleichgültige Nebenwirkung und die gleichfalls von Brefeld hervorgehobene Möglichkeit der Umkehrung gelatinirter Nährtropfen zur Vermeidung der Luftinfection wurde ganz nebensächlich, weil auf dem festen Nährboden auch die aus der Luft stammenden Keime sich streng localisirt entwickelten, so dass sie durch den Ort der Entwicklung leicht von den absichtlich hineingebrachten Keimen auseinanderzuhalten waren. Hierzu kommt noch, dass sowohl Klebs als Brefeld, um gelatinirende Zusätze in ihrem Sinne anzuwenden, schon vorher, der eine durch fractionirte Kultur, der andere durch Verdünnung, Reinkulturen haben mussten. Es findet sich weder bei Klebs noch bei Brefeld die geringste Andeutung eines Versuches oder nur einer Idee, das Gelatiniren der Lösungen zur Trennung von differenten Keimen, zur Herstellung von Reinkulturen zu benutzen, wie es Koch auf's schärfte postulirte.[1])

In einer aus lauter gleichen Organismen zusammengesetzten, zuerst durch das Mikroskop, später auch durch das blosse Auge als characteristisch wachsend erkennbaren Colonie summiren sich die Eigenthümlichkeiten des einzelnen Organismus. Der Gesammthabitus einer Colonie kann dadurch höchst werthvoll werden zur Differentialdiagnose von Organismen, die sich sonst der Form nach sehr ähnlich sind. Das Studium der morphologischen Differenzen, welche sich in den reinen Colonien

[1]) Wenn Zopf in seinem Werke über die Spaltpilze Koch's Methode nebenbei unter Brefeld's Methode der Gelatinekultur erwähnt, so nimmt er keine Rücksicht auf die eignen Angaben beider Forscher, da es kaum etwas Verschiedeneres geben kann als diese beiden Methoden, abgesehen davon, dass die unabhängigen Angaben von Klebs sich mit denen von Brefeld im Wesentlichen decken, also immerhin mit zu erwähnen gewesen wären.

documentiren, ist es besonders, welches diese bakteriologische Methode für die Hygiene brauchbar gestaltet hat.

Der Nachweis, dass eine mit blossem Auge und bei schwächeren Vergrösserungen (bis zu etwa 80 bis 120fach) sich einheitlich repräsentirende und characteristisch wachsende Colonie aus einem einzigen Keime hervorgeht, war vor Mittheilung der Methode sicher gestellt und wurde später treffend von Hansen (S. 86) erbracht. Bei einiger Uebung lernt man erkennen ob eine Colonie einem Keime entstammt, oder ob sie aus einer Vereinigung mehrerer Colonien hervorgegangen ist.

### *A. Durchsichtige, feste Substrate durch Zusatz gelatinirender Substanzen; „Nährgelatine".*

Herstellung der Nährgelatine. Man setzt zu einer der bewährten Nährlösungen, Decocte oder Infuse reinste, kleingeschnittene Gelatine, und zwar für die Reagirglaskulturen am besten 5% für die Objectträger- und besonders für die Plattenkulturen 10%. Diese Gelatine lässt man eine halbe bis einige Stunden quellen, löst sie dann unter mässigem Erwärmen vollständig auf. Da die Gelatine sauer reagirt, die meisten Bakterien aber neutrale oder schwach alkalische Reaction erfordern, wird die warme Gelatinelösung mit Natriumcarbonat neutralisirt, oder für die meisten Fälle noch besser überneutralisirt bis zur ganz schwachen Bläuung von rothem Lackmuspapier.

Die neutralisirte Gelatinelösung wird dann zur völligen Ausscheidung der Neutralisationspräcipitate und aller durch Hitze coagulirbaren Substanzen ungefähr eine Stunde auf dem Wasserbade gekocht und darauf heiss durch ein angefeuchtes Faltenfilter filtrirt. Das Filtrat muss nach erneutem Aufkochen in der Kälte klar ohne jede Trübung erstarren; eine vorübergehende Trübung beim Aufkochen durch Phosphate, welche in der Kälte wieder schwindet, hat nichts zu sagen.

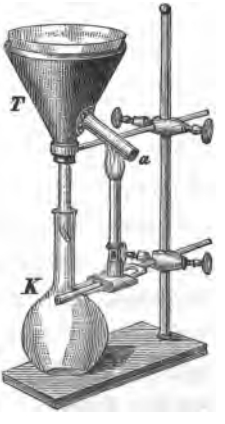
Es giebt selbstverständlich keine Nährgelatine, welche allen Bakterien gleich gute Existenzbedingungen bietet. Aber es bleibt wünschenswerth gelatinirte Lösungen zu besitzen, welche möglichst

universell verwerthbar sind, so dass sie möglichst vielen Bakterienarten wenigstens so günstige Bedingungen bieten, dass sich die Keime bis zu erkennbaren und trennbaren Colonien entwickeln können. Dies leistet die von Löffler[1]) eingeführte Fleischwasser-Pepton-Gelatine, welche jetzt in folgender Weise hergestellt wird: $^1/_2$ kg gutes, fein gehacktes Fleisch wird mit 1 Liter destillirtem Wasser versetzt, gut durchgerührt und bleibt im Eisschrank 24 Stunden stehen. Dann wird dasselbe durch Gaze, eventuell mit einer besonderen Fleischpresse, gepresst und die Flüssigkeit durch Zusatz von destillirtem Wasser wieder auf 1 Liter gebracht. Zu diesem Fleischwasser fügt man 10 gr trocknes Pepton, 5 gr Kochsalz und 50 resp. 100 gr reinste Gelatine. Das Aufquellen, Lösen der Gelatine, Neutralisiren, Aufkochen und Filtriren geschieht wie erwähnt.

Denselben Zweck erreiche ich etwas einfacher durch eine Nährgelatine, welche besteht aus Pepton 3%, Trauben- oder Rohrzucker 0,5% und Fleischextract 0,5% mit 5 resp. 10% Gelatine. Der kleine Zusatz von Zucker macht diese sonst viel weniger universell brauchbare Lösung zu einer für dieselben Zwecke brauchbaren.

Die aufgekochte, neutralisirte Nährgelatine muss heiss filtrirt werden. Man bedient sich am bequemsten hierzu eines Heisswassertrichters, Fig. 15 (T), bei dem die zwischen dem Glastrichter und dem äusseren Kupfermantel befindliche Wasserschicht durch eine Flamme warm gehalten wird, welche unter dem seitlichen, mit dem Wassermantel in Verbindung stehenden Ansatze a angebracht wird. Weniger bequem gelingt es, wenn man successive kleine, heisse Portionen filtrirt, wobei man vortheilhaft durch eine kleine Flamme den Glastrichter von Zeit zu Zeit vorsichtig anwärmt.

Fig. 15.




Die neutrale, klare Nährgelatine wird dann mit Hülfe eines sterilisirten Trichters oder einer Pipette in sterilisirte Reagirgläser gefüllt zu ungefähr einem Drittel des Inhalts der Gläser,

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 169.

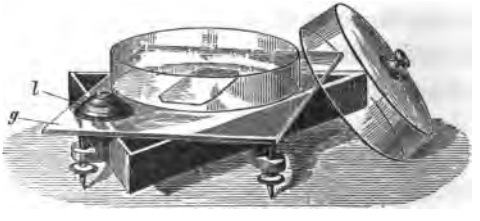
etwa 10 ccm entsprechend, und der sterilisirte Watteppropf darauf wiederauf gesetzt. Diese in Reagirgläsern befindliche Nährgelatine wird sterilisirt durch discontinuirliches Kochen. Man kann zu diesem Zwecke die in den Reagirgläsern erstarrte Gelatine direct in der Flamme vorsichtig lösen und dann in der Flamme aufkochen oder dieselbe durch Einsetzen der Reagirgläser in warmes Wasser erst lösen, dann nach Abtrocknen der Gläser in der Flamme kurz aufkochen oder auch einige Tage hintereinander je 10 Minuten im Wasserbade kochen. Dieses Aufkochen wiederholt man an 4 bis 5 Tagen je einmal. Hat die Gelatine längere Zeit gestanden, so dass sie anfängt durch Verdunsten abzunehmen, so muss sie vor dem Gebrauche noch einmal verflüssigt und aufgekocht werden.

Diese fertige Nährgelatine findet Verwendung zu Objectträgerkulturen, zu Plattenkulturen und zu Reagirglaskulturen.

### a. Objectträgerkulturen, Taf. I, Fig. 1—3.

Die im Reagirglase befindliche Gelatine wird durch Aufkochen oder Erwärmen bei ca. 30 ° im Wasserbade verflüssigt und der Wattepfropf, soweit er vorsteht, vor dem Oeffnen der Vorsicht halber zur Vernichtung etwa darauf angesammelter Pilz- oder Bakterienkeime in der Flamme verkohlt. Die Objectträger werden mit Mineralsäuren, Wasser, Alkohol, Aether gründlich gereinigt und durch ein- bis zweistündiges Verweilen bei 150 bis 160 ° im Trockenschranke sterilisirt. Man bringt zu diesem Zwecke eine Anzahl reiner Objectträger in ein kleines Becherglas, über welches man ein grösseres stülpt, so dass die Abkühlung gegen Staub geschützt vor sich geht. Zum Auftropfen der Gelatine legt man eine Anzahl Objectträger, durch übergedeckte Glasglocke gegen Staub geschützt, möglichst horizontal auf einen Tisch oder eine Glasplatte. Am bequemsten bedient man sich hierzu des Apparates, Fig. 16. Derselbe besteht aus einem mit Stellschrauben versehenen Dreieck von Holz, auf welches eine geschliffene Glasplatte g aufgelegt wird.

Fig. 16.



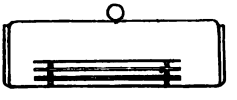
Diese Glasplatte wird mit Hülfe einer Libelle l und der Stellschrauben horizontal eingestellt. Unter der Glasplatte ist Raum zum Anbringen einer Schale mit kaltem Wasser oder Eis, um die Glasplatte stark abzukühlen, wodurch das Festwerden der Gelatine beschleunigt wird.

Mit einer sterilisirten Pipette nimmt man darauf von der verflüssigten Gelatine und trägt dieselbe durch Auslaufenlassen aus der Pipette in Form eines langen, flachen, einige Millimeter dicken, nirgends den Rand des Objectträgers berührenden Streifens, Taf. I, Fig. 1, auf. War es nicht möglich die Objectträger ganz horizontal einzustellen, so kann man sich dadurch helfen, dass man die Gelatine durch Eintauchen der Reagirgläser in kühles Wasser oder Unterhalten unter eine Wasserleitung so weit abkühlt, dass sie nicht mehr ganz dünnflüssig ist, sondern mehr zähflüssige Beschaffenheit zeigt.

Sind diese Gelatinstreifen so weit erstarrt, dass die Gelatine noch nicht vollständig fest, sondern sehr zähflüssig ist, so impft man dieselbe, indem man mit einer sterilisirten Platinnadel eine Spur der zu impfenden Substanz oder Flüssigkeit entnimmt und dieselbe durch leichtes, nicht bis auf den Objectträger reichendes Ritzen strichförmig einträgt durch 3 bis 5 Impfstriche, Taf. I, Fig. 1. Beim vollständigen Erstarren der Gelatine werden dann die Keime fixirt und, wenn nicht zu viele in einem Striche sich befanden, auch von anderen Keimen soweit getrennt, dass jeder isolirt zu einer Colonie auswachsen kann.

Die geimpften Objectträger werden in eine feuchte Glocke, Fig. 9, gebracht. Auf Bänke von Glas oder Zinkblech bringt man 2 bis 4 solcher Objectträger der Quere nach, deckt zum Schutze eine zweite Glasbank darüber, und kann auf diese Weise mehrere Etagen über einander anbringen Fig. 17. Diese Glasbänke werden sorgfältig gereinigt und vor dem Gebrauche durch Hitze sterilisirt. Derartige Bänke stellt man sich her indem man etwa 4 cm breite und 16 cm lange Streifen von Zinkblech an jedem Rande 1 bis 1,5 cm weit umbiegt, oder indem man auf 4 cm breite ca. 14 cm lange Glasstreifen am Rande schmale Glasleisten mit

Fig. 17.



Canadabalsam aufkittet. Auf diese Bänke legt man einen entsprechend grossen Streifen trocknen Fliesspapiers, auf den die Objectträger kommen. Ein absoluter Schutz gegen Luftinfection wird nicht angestrebt. Die Keime aus der Luft können sich nur auf der Oberfläche der Gelatine ansiedeln und sind dadurch, selbst wenn sie zufällig auf einem Impfstriche oder in unmittelbarer Nähe zu einer Colonie auswachsen, erkennbar. In Taf. I, Fig. 3, ist bei ca. 15facher Vergrösserung, bei 2 ein solcher Luftkeim dargestellt, dessen Colonie an einer Stelle auch über den Impfstrich hinübergewachsen ist. Das Wachsthum der Colonien im Impfstriche controlirt man mit schwachen Trockensystemen bei 80 bis 150facher Vergrösserung. Sind in einem Impfstriche verschiedenartige Colonien gewachsen, so überträgt man bei der zweiten Impfung durch Entnahme der Probe unter Zuhülfenahme eines Präparirmikroskops, bei 15 bis 20facher Vergrösserung, von jeder solchen differenten Colonie auf besondere Objectträger, so dass man nach einigen Uebertragungen auf jedem Objectträger nur eine einzige Form hat.

Für alle Gelatinekulturen ist noch folgendes zu merken. In Bezug auf ihr Verhalten zu Gelatine kann man alle Bakterien practisch eintheilen, in solche, welche die Gelatine fest lassen, und in solche, welche die Gelatine verflüssigen. Die ersteren wachsen im Innern der Gelatine in kugliger (Taf. I, Fig. 1 an einigen Stellen, und Fig. 3) oder ellipsoider, oder Scheibenform u. s. w., während sich an der Oberfläche ein characteristisches Oberflächenwachsthum bald in Form scharf umschriebener Kreise (Taf. I. Fig. 1), bald in blatt- oder traubenähnlicher Anordnung, oder in Form concentrischer Ringe u. s. w. ausbildet. Von solchen Bakterien überträgt man sowohl von den isolirten Colonien im Innern, als vom Rande der oberflächlich wachsenden Colonien. Die verflüssigenden Bakterien thun dies gleichfalls in verschiedener Weise (Taf. I, Fig. 2, Fig. 4); bald rapide, bald nur langsam trichterförmig. Da mit Fortschreiten der Verflüssigung die Vortheile des festen Nährbodens verloren gehen, hat man diese Formen möglichst schnell von den anderen zu trennen, indem man möglichst wenig Keime verimpft, so dass die Berührung der verflüssigenden mit anderen erst eintreten kann, wenn die Colonien schon genügend zur Ueber-

tragung entwickelt sind. Man entnimmt immer vom Rande, wo die Verflüssigung eben übergreift auf die noch feste Gelatine, weil im Innern der Verflüssigung schon eine Vermischung mit anderen Formen vor sich gegangen sein kann. Zum Uebertragen wählt man Colonien, welche bei mikroskopischer Controle durch Trockensysteme einen durchaus einheitlichen Eindruck machen und bei denen die characteristischen Differenzen möglichst scharf ausgesprochen sind. Ausserdem ist es zur Controle erforderlich, von den übertragenen Colonien mikroskopische Deckglas-Trockenpräparate herzustellen. Unter directer Controle eines schwachen Trockensystems, oder eines besonderen Präparirmikroskops entnimmt man mit einer sterilisirten Platinnadel die zu übertragende Probe. Es ist einige Uebung nöthig zur Erlangung der manuellen Geschicklichkeit, um mit der Platinnadel nicht vorher andere Parthien der Oberfläche, sondern nur genau die zu verimpfende Stelle zu treffen.

### b. Plattenkulturen[1]), Taf. I, Fig. 4.

Erforderlich sind Glasplatten von der Stärke der Objectträger und einer Breite, dass alle Punkte ihrer Oberfläche nach einander mikroskopisch zugänglich gemacht werden können; das Verhältniss der Breite zur Länge beträgt je nach der Breite des Objecttisches des Mikroskopes etwa 8:14 oder 10:12 cm. Diese Platten werden gründlich gereinigt (Mineralsäuren, Wasser, Alkohol, Aether), dann in ein entsprechend grosses, mit Deckel verschlossenes Blechgefäss gesetzt und 2 Stunden durch 150 bis 160° sterilisirt. Nach dem Abkühlen wird eine solche Glasplatte auf die Spiegelscheibe des Apparates, Fig. 16, gelegt und durch Ueberdecken einer reinen Glasglocke gegen Staub geschützt. Die Gelatine wird darauf im Wasserbade bei 30° oder durch Aufkochen verflüssigt und wieder soweit abgekühlt, dass sie noch eben gut flüssig ist. Der festsitzende Wattepfropf des Reagirglases wird durch Drehen mit

[1]) Zuerst demonstrirt bei Gelegenheit der Hygieneausstellung und in einem Vortrage von Koch auf dem XI. deutschen Aerztetage 1883 zu Berlin. In letzter Zeit sind Anweisungen zu diesen Kulturen erschienen von Biedert als Separat-Abdruck aus der deutschen Medicinal-Zeitung 1884 und von Johne Ueber die Koch'schen Reinkulturen 1885.

einer vorher geglühten Pincette gelockert, so dass das Abnehmen leicht und schnell vorgenommen werden kann; vortheilhaft ist es die oberen Parthieen des Wattepfropfs zur grösseren Sicherheit durch Erhitzen in der Flamme von etwaigen daraufgefallenen Keimen zu befreien. Ist das Reagirglas mit der Gelatine derart vorbereitet, so wird es mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand gefasst und möglichst schräg gehalten, aber ohne dass die Gelatine den Wattepfropf berührt. Darauf taucht man den vorher geglühten Platindraht oder die Platinöse in das zu übertragende Material, fasst den Glasstab, in welchem der Platindraht eingeschmolzen ist, schreibfederartig mit der rechten Hand, nimmt mit 4. und 5. Finger der rechten Hand den lockeren Wattepfropf ab und führt den geraden Platindraht oder die Platinöse in die flüssige Gelatine ein, bewegt ihn darin hin und her, streicht ihn an der Wand ab, zieht den Glasstab heraus, setzt schnell den Wattepfropf wieder auf. Darauf wird durch Drehen, Neigen oder leichtes Schütteln das eingebrachte Material möglichst gleichmässig in der Gelatine vertheilt. Dann giesst man die flüssige Nährgelatine mit den in ihr vertheilten Keimen auf die Mitte der Glasplatte und vertheilt die Gelatine auf derselben mit einem durch Glühen sterilisirten und wieder abgekühlten Glasstabe oder Platindraht. Diese Platte wird in einer feuchten Glocke auf eine Glasbank gelegt und darüber eine zweite Glasbank gestellt, so, dass auch hier mehrere Etagen von Glasplatten in einer Glocke Platz finden können.

Während bei den Objectträgerkulturen nicht die ganze Gelatine sondern nur die Impfstriche und ihre nächste Umgebung ausgenutzt wird, und während ausserdem eine relativ grosse Menge von Keimen auf relativ wenig Impfstriche zur Vertheilung kommt, wird bei den Plattenkulturen eine relativ kleine Menge Keime auf eine verhältnissmässig viel grössere Menge Gelatine vertheilt. Dementsprechend ist die Vertheilung der Keime in der noch flüssigen Gelatine eine weit bessere, sodass die einzelnen Keime, durch die erstarrende Gelatine fixirt, weit besser von anderen Keimen getrennt, isolirt zur Entwicklung einer Colonie kommen können. Welche enorme Anzahl von Keimen auf diese Weise sicher von einander auf einer einzigen Gelatinplatte getrennt werden können, zeigt die Fig. 4 der Taf. I,

bei welcher jeder Colonie ein einziger isolirter Keim entspricht und in der erst wenige Colonien sich berührt haben.

Alle Colonien, welche Differenzen zeigen, werden nun erst mikroskopisch geprüft und dann von denselben durch eine zweite Uebertragung Reinkulturen hergestellt. Zu diesem Zweck wird ganz in derselben Weise unter Controle des Mikroskops oder des Präparirmikroskops eine Spur von einer reinen Colonie in neue Gelatine gebracht und von dieser eine neue Plattenkultur angelegt, in der dann aber bis auf etwaige Luftinfectionen nur dieser eine Organismus zur Entwicklung kommt. Man kann also bei der zweiten Uebertragung schon ganz sichere Reinkulturen haben. Luftinfectionen sind bei dem Oeffnen nicht ausgeschlossen, aber einmal sind sie nicht annäherend so zu fürchten, wie die Infectionen durch unsicher sterilisirte Instrumente und Hände und dann müssen sich auch diese Keime isolirt entwickeln. Hat die Luftinfection beim Oeffnen und Impfen der Reagirgläser stattgefunden, so können sich diese Luftkeime natürlich ebenso in der Gelatine entwickeln, wie die absichtlich hineingebrachten; aber ihre spärliche Zahl wird im Verhältniss zu den übrigen Organismen einen Anhalt ihrer Herkunft geben und dann macht man nicht nur eine einzige, sondern mehrere Plattenkulturen von einem Material, von dem die eine immer die andere controliren hilft. Hat nach dem Erstarren eine Luftinfection stattgefunden, so ist diese durch ihre ganz oberflächliche Lage meist leicht zu erkennen, wie 2 in Fig. 3, Taf. I.

In der Mehrzahl der Fälle genügt dieses Verfahren. Aber hin und wieder, bei Faulflüssigkeiten, Eiter, Fäces, stark verunreinigtem Wasser, ist die Zahl der mit einem Bakterientropfen, mit einer Spur übertragenen Keime so gross, dass keine genügende Isolirung der einzelnen Keime eintritt, sondern dass diese sich berühren vor Auftreten erkennbarer characteristischer Wachsthumsdifferenzen.

In diesen Fällen muss die Verdünnung noch weiter getrieben werden und dies kann man in zweierlei Weise erreichen. Einmal kann man das mit der Platinöse entnommene Material in sterilisirtes destillirtes Wasser bringen, durch Schütteln vertheilen

und dann von dieser mehr oder weniger verdünnten Mischung einen Tropfen zum Inficiren der flüssigen Gelatine benutzen.

Ein zweites Verfahren lehnt sich an die fractionirten Kulturen an. Man impft erst ein Glas in der geschilderten Weise, das „Original". Nach gründlicher Vermischung überträgt man aus diesem Glase zur „ersten Verdünnung" in ganz derselben Weise einige, z. B. 5, kleine Tröpfchen. Man hält das Originalglas zwischen Daumen und Zeigefinger, das noch zu inficirende zwischen Zeigefinger und Mittelfinger der linken Hand, nimmt erst den Pfropf von dem Original ab, legt ihn, mit Pincette gefasst, zur Seite oder giebt ihn zwischen vierten und fünften Finger der linken Hand, welche dann gleichzeitig zwei Gläser und einen Pfropf zu halten hat. Darauf nimmt man mit viertem und fünftem Finger der rechten Hand den Pfropf von dem zweiten Glase, taucht die Platinöse in das Originalglas und trägt diesen Tropfen in das zweite Glas ein. Durch Hin- und Herbewegen sorgt man dafür, dass sich beim Herausnehmen kein Gelatinetropfen in der Oese befindet. Man wiederholt dann mit derselben oder einer vorher zurecht gelegten zweiten Platinöse diese Uebertragung noch einmal und fährt so etwa fünfmal fort. Dann setzt man erst den mit der rechten Hand gehaltenen Pfropfen auf das frisch inficirte Glas, dann den in der linken Hand gehaltenen auf das Originalglas. Nun hat man das Original = 0 und die erste Verdünnung = I fertig. Darauf macht man eventuell noch eine zweite = II und selbst eine dritte, mit III bezeichnete, Verdünnung in ganz derselben Weise mit derselben Zahl Tropfen von der je vorausgegangenen Kultur. Jedes dieser Gläser liefert eine mit 0, I bis III bezeichnete Plattenkultur, die man in derselben feuchten Glocke etagenweise unterbringt. Jede dieser Kulturen controlirt die andere.

Hat man so eine Anzahl differente Bakterien getrennt, so macht man von jeder derselben eine Plattenkultur für sich, welche dann bis auf eine etwaige Luftinfection eine Reinkultur eines einzigen der in dem ursprünglichen Gemische vorhandenen Arten enthält. Diese Uebertragungen der rein kultivirten Organismen wiederholt man nun öfters mit besonders characteristisch gewachsenen, mikroskopisch geprüften Colonien, um auf diese Weise

auch jede gelöste chemische Beimengung des ersten Substrates zu eliminiren.

### c. Reagirglaskulturen, Taf. II, Fig. 5.

Bei längerer Dauer ist eine Luftinfection bei dem geringen Schutze der Objectträger- und Plattenkulturen kaum zu vermeiden, die besonders dann unbequem wird, wenn durch dieselbe eine Verflüssigung der Gelatine herbeigeführt wird. Es wird deshalb nöthig, die Kulturen öfters auf neue Objectträger oder Platten umzuzüchten. Einerseits um ein zu häufiges, oft recht lästiges, zeitraubendes oder den Platz beschränkendes Umzüchten zu vermeiden, besonders aber um ein einmal reingewonnenes Material sicher zu conserviren, bedient man sich der Reagirglaskulturen, in denen ausserdem manche Wachsthumseigenthümlichkeiten sich besser markiren.

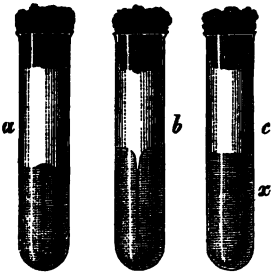
Das mit erstarrter, sicher sterilisirter Nährgelatine versehene Reagirglas bedarf keiner anderen Vorbereitung, als dass der Wattepfropf durch Drehen mit geglühter Pincette zum schnellen Oeffnen gelockert wird. Dann wird mit einer ausgeglühten Platinnadel unter Controle des Mikroskops eine Spur der reinen Kultur genommen. Die linke Hand fasst darauf das Glas so, dass die Oeffnung nach unten sieht; dann wird mit dem vierten und fünften Finger der rechten Hand oder mit der Pincette der Wattepfropf abgenommen und mit dem Platindraht des zwischen rechtem Daumen und Zeigefinger gefassten Glasstabes ein oder mehrere Stiche in die Gelatine gemacht (Fig. 18). Zum Schlusse wird, noch während die Oeffnung nach unten gerichtet ist, der Wattepfropf wieder fest eingesetzt.

Fig. 18.

Das Schicksal einer solchen Stichkultur ist je nach den verimpften Bakterien ein sehr differentes. Als allgemeiner Anhalt mögen folgende Daten dienen. Bei den die Gelatine nicht verflüssigenden Bakterien (Taf. II, Fig. 5) bildet sich das characteristische Oberflächenwachsthum von der Einstichöffnung derart aus, dass bald flache oder stärker prominirende Köpfchen erstehen, welche in Verbindung mit dem Impfstiche der Kultur das Aussehen eines Nagels

verleihen, „Nagelkulturen“ von Friedländer, Fig. 19a; statt eines solchen, mit dem Nagelkopf vergleichbaren köpfchenähnlichen Wachsthums, wachsen andere auf der Oberfläche in Form concentrischer Ringe, oder blatt- oder traubenförmiger Gebilde. Einzelne zeigen intensives Oberflächenwachsthum und mangelhaftes Wachsthum in dem Impfstiche, bei anderen verhält es sich gerade umgekehrt. Die Kulturen erscheinen bald trocken, bald schleimig, andere sind glänzend, andere durchscheinend. Die Farben der Kulturen sind höchst differente; die Gelatine selbst verändert bald die Farbe, bald nicht; oft tritt ein besonderer Geruch auf. Alle diese kleinen morphologischen und biologischen Differenzen sind zu beachten, weil sie die Differentialdiagnose erleichtern.

Fig. 19.




Bei den die Gelatine verflüssigenden Bakterien geschieht dies zum Theil ganz allmählich, so dass die Gelatinekultur ein leicht trichterförmiges Ansehen gewinnt, Fig. 19b, bei anderen schneller; es entstehen dabei breitere Trichter, oder die Verflüssigung schreitet mehr schichtenweise vor sich. Bald bilden sich Häutchen an der Oberfläche, bald nicht; oft sieht man an der Grenze zwischen verflüssigter und noch fester Gelatine, x der Fig. 19c, die Kultur in Form von verschieden gestalteten Wolken vorwärts schreiten. Bisweilen scheint die Verflüssigung streng an das Fortschreiten der Vegetation gebunden, manchmal ihr vorauszueilen, als ob verflüssigende Stoffe von den Bakterien producirt würden, welche weiter wirken als das sichtbare Wachsthum reicht. Auch bei den verflüssigenden Bakterien können die Kulturen verschiedene Farben bilden und die Gelatine kann Farbenveränderungen erleiden; es können Gerüche auftreten. Auch diese Differenzen sind sämmtlich zu beachten.

Die Grenzen der Anwendbarkeit der gewöhnlichen gelatinirenden Zusätze, wie Hausenblase, Caraghen, Gelatine liegen bei ca. 25° C., weil in den brauchbaren Concentrationen bei dieser Temperatur vollständige Verflüssigung

eintritt und damit die Vortheile des festen Nährbodens verloren gehen.

Will man bei Brüttemperaturen die Vortheile des gelatinirenden Zusatzes zur Erzielung der Durchsichtigkeit und Festigkeit benutzen, so nimmt man statt Gelatine die von Gracilaria lichenoides und Gigartina speciosa gewonnene, Agar-Agar genannte, Pflanzengallerte.

Statt 5 bis 10 % Gelatine fügt man den Lösungen 1,5 bis höchstens 2 % kleingeschnittenes Agar-Agar bei, lässt dasselbe im Eisschrank 24 Stunden aufquellen und löst dasselbe durch Kochen möglichst vollständig auf; das Aufquellen kann bei langsamem Anwärmen auch unterbleiben. Die heisse Lösung wird mit Natriumcarbonat neutralisirt und dann zwei Stunden auf dem Wasserbade oder eine Stunde im Dampfstrome gekocht zur Ausscheidung der durch Hitze gerinnbaren Substanzen und der Neutralisationspräcipitate. Selbst wenn man die ausgeschiedenen Stoffe durch dichte Gaze vorher möglichst abscheidet, filtriren diese Agar-Agarlösungen, auch in kleinen Mengen, recht schlecht, selbst im Heisswassertrichter. Nach Rosenbach[1]) filtrirt man besser durch Watte, während das Aufnahmegefäss mit dem mit Watte oder mit Glaswolle gefüllten Glastrichter im Dampfapparat sich befindet.

Das Einfüllen der Agar-Agarlösung, welche aber in dickeren Schichten selten so klar erscheint wie gleich dicke Gelatineschichten, und das Sterilisiren geschieht wie bei der Gelatine. Ebenso das Impfen zu den Plattenkulturen. Man verflüssigt die feste Gallerte bei ca. 42° im Wasserbade und nimmt das Impfen und Vertheilen der Keime in der verflüssigten Agar-Agarlösung vor, während die Gläser noch zum Theil in das warme Wasser eintauchen, da diese Lösung unterhalb 40° ihre ganz flüssige Beschaffenheit verliert. Bei Temperaturen über 42°, bei denen die Verflüssigung leichter ist, leiden die Keime, so dass die Operationen zwischen 40 und 42° ausgeführt werden müssen. Das Ausgiessen der geimpften Gläser auf die Platte muss deshalb möglichst schnell geschehen. Eine ca.

[1]) Mikro-Organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen 1884, S. 16.

1,5%ige Agar-Agar-Gelatine ist bei 37° C. so fest, um alle Vortheile des durchsichtigen und festen Nährbodens auch bei dieser hohen Temperatur im Brütofen zu gewähren. Manche Bakterien wachsen in Agar-Agar schlechter als in Gelatine. Dafür hat aber dieser Nährboden einen von Rosenbach hervorgehobenen und mit grossem Vortheil ausgenützten Vorzug, dass die meisten Bakterien, welche die Gelatine verflüssigen und bei denen in Folge dessen auf Gelatine kein Oberflächenwachsthum zu Stande kommt, das Agar-Agar nicht verflüssigen, sondern im Gegentheil auf demselben ein sehr characteristisches Oberflächenwachsthum zeigen.

Man kann in Folge dessen das Wachsthum auf Agar-Agar benutzen zur Ergänzung der Kulturen in Gelatine und dadurch die Zahl der Merkmale, welche schon dem blossen Auge eine Differential-Diagnose gestatten, nicht unwesentlich vermehren.

Koch's Methode der Reinkulturen mit festen und durchsichtigen Medien gewährt in Form der Plattenkulturen, mit Gelatine bei Zimmertemperatur, mit Agar-Agar für Brüttemperatur, bei grösster Einfachheit die meiste Garantie für sichere Trennung differenter, noch so zahlreicher Keime aus Bakteriengemischen.

Bei dieser schon erreichten grossen Einfachheit der rein technischen Seite der Forschung kann nicht viel von einem

**Improvisiren**

die Rede sein, da auch hierbei die volle Sicherheit unter allen Umständen gewahrt sein muss. Die Erfahrungen mit den sogenannten expeditiven Methoden haben besonders in der Hygiene für jeden unbefangen Urtheilenden zur Genüge gelehrt, dass nur diejenigen, welche derartige Methoden ausgearbeitet haben, und die gründlich geschulten und geübten Forscher sich derselben bisweilen mit Vortheil, oft wenigstens ohne Nachtheil bedienen können, während Anfänger und Ungeübte, für die sie eigentlich bestimmt sind, fast ausnahmslos durch dieselben irre geführt werden.

Wer sich mit Bakterien-Forschung wirklich beschäftigen oder gar dienstliche Gutachten auf eigene Beurtheilung gründen will,

wird unter allen Umständen neben dem entsprechenden Mikroskope mit Oelimmersion und Abbé'schem Beleuchtungsapparat sich die nothwendigsten Apparate anschaffen müssen. Bei einer etwaigen Reise, einer grösseren oder kleineren Expedition kann es sich dagegen oft darum handeln, nicht zu viel mitzunehmen und die eine oder andere Operation erst ausserhalb ohne die bequemeren Hülfsmittel des Laboratoriums vorzunehmen. Hier wird nur der das Richtige improvisiren, der in Laboratoriums-Arbeiten sich geübt hat und deshalb die Grenzen des mit Sicherheit Erreichbaren beurtheilen kann, oder es müssen diese kleinen Erleichterungen unter sicherer Leitung eingeübt werden wie andere Laboratoriumsarbeiten, dann haben sie aber mit Improvisiren nichts mehr zu thun.

In diesem Sinne kann man statt der Gasflamme sich einer Spiritusflamme bedienen. Die Platten reinigt man mit 1 p. M. Sublimatlösung und Spiritus, trocknet sie über der Spiritusflamme und sterilisirt sie dann dadurch, dass man eine Fläche derselben in ihrer ganzen Ausdehnung in der Spiritusflamme stark erhitzt, wobei man die Platte mit einer Pincette hält. Dann legt man diese Platte mit der erhitzten Seite nach oben auf ein Stück reines Papier, welches auf einem möglichst horizontalen Tische liegt, deckt einen mit Sublimat und Spiritus gereinigten Suppenteller darüber und lässt sie so erkalten.

Hat man keine Gelatine in Reagirgläsern mitgenommen, sondern eine grössere Menge sterilisirter Gelatine in einem grösseren Kolben bei sich, so kann man ein Reagirglas in folgender Weise sterilisiren. Man reinigt es erst mit 1 p. M. Sublimat und Spiritus, entfernt den Spiritus und trocknet das Glas, indem man es über eine Spiritusflamme hält. Dann wird ein Wattpfropf mit einer stark erhitzten Pincette einige Centimeter weit in das Reagirglas eingeschoben, darauf der untere Theil des Glases über der Flamme bis zum Wattpfropf stark erhitzt. Nachdem das Glas so weit abgekühlt ist, dass man es im unteren Theile anfassen kann, wird das obere Drittel so stark und lange erhitzt bis die Watte sich bräunt. Nach dem Abkühlen zieht man mit erhitzter Pincette den Wattpfropf so weit hervor, dass man ihn mit den Fingern fassen kann.

Ein so sterilisirtes Reagirglas füllt man zu $^1/_5$ mit der inzwischen in heissem Wasser verflüssigten Gelatine, setzt den Pfropf wieder auf, kocht der Vorsicht halber die Gelatine noch einmal auf und lässt sie, event. durch Eintauchen in kaltes Wasser, so weit erkalten, dass sie gerade noch gut flüssig zum Impfen und Vermischen der Keime ist.

Das Ausgiessen der Gelatine auf die Platte geschieht nicht mit der ganz flüssigen Gelatine, weil die Platte nicht vollständig horizontal liegt, sondern erst dann, wenn die Gelatine ganz zähflüssig geworden ist, aber noch vor Auftreten von Klumpen.

Als feuchte Kammern kann man zwei übereinander gelegte Teller benützen, deren unteren man mit Fliesspapier auskleidet, welches angefeuchtet wird. Zwei hineingelegte Stückchen Holz dienen dann der Platte statt der Glasbänke als Unterlage.

### *B. Durchsichtige, feste Substrate ohne Zusatz gelatinirender Substanzen; Blutserum.* Taf. II. Fig. 6 und 7.

Für einige pathogene Bakterien waren die durchsichtigen festen Medien in Form der Gelatinekulturen, auch wenn zur Erreichung der Bluttemperatur Agar-Agar verwendet wurde, nicht geeignet. In diesen Fällen schlug Koch, unter strenger Wahrung des Princips der Festigkeit und Durchsichtigkeit der Nährmedien, einen ganz anderen Weg ein. Koch[1]) hatte beobachtet, dass sterilisirtes Blutserum beim Erwärmen über 65°, aber vor Erreichen der Gerinnungstemperatur, starr wurde ohne seine Durchsichtigkeit zu verlieren.

Ein derartig fest gewordenes, aber durchsichtiges Blutserum wurde nun als Nährboden eingeführt.

Zum Auffangen des Blutes dienen cylindrische, ca. 20 cm hohe und 8 bis 10 cm weite, mit Glasstöpsel versehene Glasgefässe. Diese Gefässe werden nach vorausgegangener mechanischer Reinigung durch Spülen mit 1 p. M. Sublimat sterilisirt; nach Ausgiessen des Subli-

---

[1]) Berliner klinische Wochenschrift 1882 No. 15 und Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte II. 1884 S. 48.

mats wird der Rückstand desselben mit Alkohol entfernt, der Alkohol abgegossen und der Rest desselben mit Aether aufgenommen und dieser letztere durch Erwärmen im Trockenschrank verdunstet. Unter Oeffnen des Glasstöpsels lässt man das Blut der Schlachtthiere in dieses Gefäss hineinfliessen. Die Umgebung der Stichöffnung muss gut gereinigt, zum mindesten gründlich angefeuchtet werden. Das unmittelbar nach dem Stiche ausfliessende Blut, welches Schmutzpartikel der Haut und des Felles und abgeschnittene Haare mit wegspült, fängt man nicht auf. Das Gefäss wird nahe bis zum Rande gefüllt, mit Stöpsel geschlosssn und baldigst in einen Eisschrank gestellt, in welchem es 24 bis 30 Stunden ruhig stehen bleibt, um die Bildung eines festen Blutkuchens zu ermöglichen. Wird das Gefäss während der Bildung des Blutkuchens bewegt, so werden dem Serum Blutkörperchen beigemengt, welche das Serum beim Erwärmen nicht vollständig klar werden lassen. Bei gehöriger Ruhe und Zeit bildet sich über dem Blutkuchen eine reichliche Schicht von vollkommen durchsichtigem, bernsteingelb gefärbtem Serum. Mit sterilisirten Pipetten nimmt man dasselbe auf und füllt es in sterilisirte Reagirgläser, welche zu $^1/_3$ gefüllt und dann mit Wattpfropf verschlossen werden.

Das Sterilisiren kann nur unterhalb der Gerinnungstemperatur des Eiweisses durch discontinuirliches Erwärmen geschehen. Man setzt zu diesem Zwecke die Reagirgläser in den mit passenden Einsätzen versehenen Apparat, Fig. 2; die Temperatur des Innenraums b wird auf ca. 58° gehalten. Dieser Temperatur wird das Blutserum 5 bis 6 Tage lang täglich 1 Stunde ausgesetzt. Etwas unbequemer kann man dies auch im Wasserbade erreichen. Auf dem flüssigen, sterilisirten Blutserum bildet sich oft ein Häutchen von Cholestearin, welches nicht mit Bakterienhäutchen zu verwechseln ist.

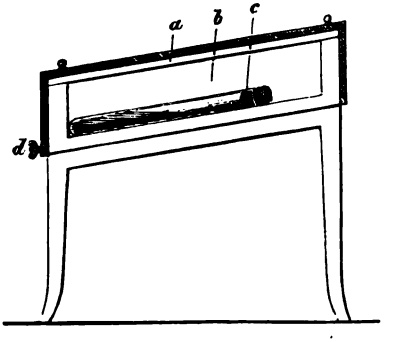
Dieses sterilisirte flüssige Blutserum, welches als solches öfters verwendet wird, wird nun zum Erstarren gebracht und zwar zur Erzielung einer möglichst grossen Oberfläche in stark geneigter Lage der Reagirgläser. Hierzu benutzt man einen mit Glasdeckel versehenen Blechkasten mit doppelter Wandung, welcher zur Aufnahme von Wasser dient. Die vordere Seite dieses Kastens

kann durch Stellschrauben, st in Fig. 20, d in Fig. 21, tiefer gestellt werden als die Rückseite. Man stellt den Kasten so schräg, dass das Blutserum, c in Fig. 21, bis zum oberen Drittel der Reagirgläser reicht, aber ohne den Wattpfropf zu berühren.

Die Regulirung der Temperatur des Luftraumes, b Fig. 21, geschieht durch ein zwischen die Reagirgläser auf den Boden gelegtes

Fig. 20.

Fig. 21.




Thermometer. Das Erstarren geschieht bei 65°; je höher die Temperatur über 65° steigt, je mehr sie sich der Gerinnungstemperatur von 75° nähert, desto schneller geht das Erstarren vor sich. Aber die Durchsichtigkeit wird um so sicherer erreicht, je niedriger die Temperatur ist; das Serum wird mit Annäherung an die Gerinnungstemperatur immer undurchsichtiger. Es ist deshalb die Temperatur von 65° möglichst genau innezuhalten und mindestens 68° nicht zu übersteigen. Das Blut verschiedener Thiere erstarrt verschieden schnell, am schnellsten das Hammelblut, am langsamsten das Kalbsblut; im Allgemeinen beträgt die Zeit $^1/_2$ bis 1 Stunde.

Ein richtig zum Erstarren gebrachtes Blutserum ist fest und hart wie hartgekochtes Hühnereiweiss, bernsteinartig, durchscheinend und nur in den unteren dickeren Parthieen schwach milchig getrübt.

Das während des Erwärmens an der oberen kühleren Wand des Reagirglases sich bildende Condensationswasser sammelt sich beim Aufrichten des Reagirglases am Boden, Tafel II Fig. 6 und 7, und bildet durch Aufnahme löslicher Substanzen eine Nährlösung, so dass man, Fig. 6, nach der Impfung gleichzeitig das Wachsthum auf

festem und flüssigem Nährboden beobachten kann, wenn man bis zum Rande der Flüssigkeit impft. Durch Verdunstung trocknet das Serum allmählich von oben anfangend ein, doch bleiben monatelang die mittleren und unteren Parthieen brauchbar.

Löffler[1]) ermittelte, dass Lösungen, welche den Nährwerth des Blutserums erhöhen, in geringer Menge zugesetzt, die Fähigkeit desselben, durchsichtig zu erstarren, nicht herabsetzen, so dass man öfters vortheilhaft statt des reinen Blutserums ein solches verbessertes Blutserum verwenden kann. Löffler fügte zu 3 Theilen Blutserum 1 Theil Fleischinfus hinzu. Das Fleischinfus wird genau so hergestellt wie bei der Bereitung der Löffler'schen Gelatine (S. 105), dann fügt man hinzu 1% Pepton, 1% Traubenzucker, 0,5% Kochsalz, kocht auf, neutralisirt mit Natriumcarbonat, kocht auf dem Wasserbade bis zur völligen Ausfällung der Albuminate und filtrirt. Diese Bouillon wird im Dampfbade sterilisirt und nach dem Abkühlen dem Serum zugesetzt und darauf das Serum mit dem Bouillonzusatze discontinuirlich sterilisirt und zum Erstarren gebracht. Selbstverständlich kann man auch andere Zusätze machen, z. B. Lösungen von Fleischextract mit Zucker etc.

Da die Reagirglaskulturen nicht direct mit dem Präparirmikroskope controlirt werden können, kann man auch das Blutserum in Uhrgläsern oder Glasklötzchen mit Aushöhlung, welche mit einer Glasplatte bedeckt werden, erstarren lassen, verzichtet aber dann auf den sicheren Schutz, welchen der Watteverschluss der Reagirgläser bildet.

Zum Impfen der Reagirgläser werden dieselben mit der linken Hand möglichst horizontal gehalten; dann die Platinöse in die Impfsubstanz eingetaucht, darauf mit dem 4. und 5. Finger der rechten Hand der vorher gelockerte Wattepfropf herausgezogen und das in der Platinöse befindliche Material durch festes, streichendes Andrücken an die Oberfläche des starren Serums auf dasselbe übertragen und darauf der Wattepfropf wieder aufgesetzt.

---

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Bd. II, 1884, S. 452 und 461.

Da einerseits in den Reagirgläsern eine directe mikroskopische Controle, und andererseits ein Isoliren der Keime durch das Erstarren selbst nicht möglich ist, wie bei den gelatinirenden Substanzen der Objectträger- und besonders der Plattenkulturen, so muss man von jedem Materiale mehrere, bis zu 10, Einzelversuche machen und ausserdem ein möglichst reines Impfmaterial besitzen. Diese beiden Momente lassen die Blutserumkulturen gegenüber den Gelatine- und Agar-Agar-Plattenkulturen als unvollkommener erscheinen. Aber bei Ueberwindung dieser technischen Schwierigkeiten ist es durch das Festhalten an dem Princip der Durchsichtigkeit und Festigkeit, welches Koch's Methode so fundamental von allen andern scheidet, gelungen, durch das starre Blutserum tadellose Reinkulturen von obligat parasitischen Bakterien zu erhalten, bei denen jede andere Methode bis jetzt versagte.

**Die Gewinnung eines reinen Ausgangsmaterials für die Blutserumkulturen**

bedarf noch einiger Erläuterungen, besonders für die Fälle, in denen wie bei der Tuberkulose die gesuchten Organismen so langsam wachsen, dass in der Zwischenzeit etwaige Mitbewerber Alles überwuchern.

Durch die vorausgegangene mikroskopische Durchmusterung von Schnittpräparaten der verschiedenen Organe, von Gewebssäften und Blut hat man sich darüber orientirt, an welchen Orten die suspecten Bakterien am sichersten und in reinstem Zustande zu treffen sind. Unter Beobachtung dieses Punktes gestaltet sich die Entnahme am sichersten, wenn die Impfsubstanz frisch getödteten oder gestorbenen Thieren unmittelbar nach dem Tode entnommen wird. Die Entnahme wird in dem Maasse schwieriger und unsicherer, je längere Zeit nach dem Tode verflossen ist, weil dann die Möglichkeit einer Vermischung mit den schnell wachsenden Fäulsnissorganismen immer mehr zunimmt.

„Alle vorbereitenden Schnitte, welche die Impfsubstanz selbst

nicht berühren, sind nach Koch[1]) mit heissen Instrumenten auszuführen, die Impfmasse aber mit abgekühlter Scheere und Pincette herauszuschneiden" resp. mit abgekühlter Platinöse zu entnehmen. „Stets hat man mit geglühten Instrumenten zu operiren, welche jedesmal, wenn eine neue Schicht bloszulegen ist, gewechselt werden. Der stete Wechsel der Instrumente ist nothwendig, damit Verunreinigungen, welche sich beim Durchschneiden der Haut und der oberflächlichen Schichten den Instrumenten anhängen, nicht in die Kulturen verschleppt werden."

Mit Rücksicht auf diese Ermittelungen gestaltet sich das Vorgehen derart, dass nach Aufspannen des Thieres auf ein Secirbrett, das Fell, soweit der Schnitt geführt werden soll, in gehöriger Ausdehnung mit 1 p. M. Sublimatlösung gründlich angefeuchtet wird, um beim Anfassen und Einschneiden ein Verstäuben von Schmutz, Haaren etc. möglichst zu vermeiden. Eine Anzahl Messer, Scheeren Pincetten werden vorher in den Flammen ausgeglüht und unter einer Glocke, gegen Berührung und Staub geschützt, niedergelegt. Dann wird die Haut in entsprechender Ausdehnung, bei grösseren Thieren mit noch heissem Skalpell, bei kleineren mit heisser Pincette und Scheere durchschnitten und auf beiden Seiten soweit zurückgelegt, um frei weiter operiren zu können. Mit einer zweiten heissen Pincette und Scheere wird nun, wenn die Entnahme an der Pleura oder Lungenoberfläche stattfinden soll, ein 1 bis 2 qcm grosses Fenster aus der Brustwand herausgeschnitten und dadurch die Oberfläche der Lunge blossgelegt. Ist hierbei eine afficirte Stelle, z. B. Tuberkelknötchen, blossgelegt, so nimmt man ein oder mehrere derartige Knötchen mit abgekühlten Instrumenten heraus. Um speciell die in den Tuberkelknötchen befindlichen Bakterien frei zu machen, zerschneidet man mit abgekühltem Messer oder Scheere ein Knötchen und versucht aus dem Innern mit abgekühlter Platinöse Partikelchen zu entnehmen, die man auf die Oberfläche des Blutserums impft, oder man zerquetscht ein Knötchen zwischen zwei abgekühlten Skalpellen und nimmt mit Platindraht diese zerquetschte Masse, um sie zu verimpfen. Bei weniger harter Consistenz schneidet man mit abgekühltem Messer ein und entnimmt das Material mit der Platinöse.

[1]) Mittheilungen Bd. II, 1884, S. 50.

Soll Blut aus dem Herzen entnommen werden, so wird, nachdem die Haut ebenso durchschnitten ist, der Brustkorb mit heisser Pincette und heissem Messer resp. Scheere über dem Herzen geöffnet, ebenso das Pericardium mit frischen Instrumenten. Darauf fasst man die Herzspitze mit abgekühlter Pincette und eröffnet mit abgekühltem Skalpell eine Herzhöhle, aus der man mit abgekühlter Platinöse das zu übertragende Blut entnimmt.

Soll ein anderes Organ gewählt werden aus der Bauchhöhle, so wird dasselbe, bei derselben Art der Eröffnung der Bauchhöhle, mit geglühten Instrumenten herausgenommen, auf einen reinen Untersatz oder Fliesspapier gelegt und dann nur die bindegewebige Umhüllung eingeschnitten; darauf fasst man die Ränder mit zwei abgekühlten Pincetten und reisst das Organ tief ein, dann entnimmt man mit Platinöse aus der Tiefe des Risses Gewebssaft oder Gewebspartikel.

Bei oberflächlich gelegenen Lymphdrüsen schneidet man die Haut wieder in derselben Weise durch, fasst dann die Drüse mit abgekühlten Instrumenten und schneidet sie in situ durch zur Entnahme aus dem Inneren, oder löst sie aus der Umgebung, legt sie auf eine vorher geglühte und wieder abgekühlte Glasplatte, schneidet oder reisst sie ein und entnimmt aus dem Innern Saft oder Gewebspartikel.

Wenn Blut intra vitam zu Kulturen entnommen werden soll, so kann dies mit einer Haarröhre nach Salomonsen geschehen. Man kann auch bei Gelegenheit eines Aderlasses Tropfen Blut aus einer Hautvene mit Platinöse entnehmen. Am einfachsten ist es, eine Hautstelle von den Haaren zu befreien, die Stelle mit Bürste und Seife zu reinigen, dann mit 1 p. M. Sublimatlösung abzuwaschen, mit Alkohol und endlich mit Aether die letzten Spuren Sublimat zu entfernen. Dann sticht man mit sterilisirter Nadel ein oder macht mit sterilisirtem Messer einen leichten Schnitt, nimmt die ersten vorquellenden Tropfen mit Platinnadel weg und braucht die später vorquellenden Tropfen zum Impfen.

Zur Entnahme von Hautstückchen wählt man bei Erysipelas und ähnlichen in der Haut verlaufenden parasitären Processen eine Stelle, an welcher der Process vorwärtsschreitet. Die Haut wird in

derselben Weise gereinigt und dann mit geglühten Instrumenten ein Stückchen Haut herausgeschnitten, welches event. noch weiter zerkleinert resp. zerquetscht wird.

Ist schon einige Zeit nach dem Tode verstrichen, so müssen die Organe erst gründlich von aussen anhaftenden Fäulnissorganismen gereinigt werden. Nach Koch l. c. erreicht man dies, indem man das Organ wiederholt und gründlich in 1 p. M. Sublimatlösung wäscht, dann mit zu jedem Schnitte gewechselten, heissen Instrumenten von der Oberfläche ab Schichten des Organs abträgt und erst in grösserer Tiefe den Gewebssaft oder Gewebspartikel entnimmt.

Bei grösseren Organen, z. B. der Milz, legt man nach Gaffky[1]) nach gründlichem Waschen in 1 p. M. Sublimatlösung zuerst einen fast das ganze Organ trennenden Längsschnitt. Dann wird mit einem zweiten sterilisirten Messer auf die gewonnene reine Schnittfläche ein nirgends bis an die Kapsel reichender Schnitt geführt, auf diesen ein dritter und erst dann aus der Tiefe Gewebssaft oder Partikel entnommen.

Nach Löffler[2]) verfährt man, um selbst hochgradig verunreinigte Organe noch zu verwerthen, derart, dass man das Organ erst 10 Minuten, unter stetem Bewegen mit einem Glasstabe, in einer 5% igen Carbolsäurelösung lässt, um alle an der Oberfläche haftenden Kokken, Bacillen, Hefen etc. zu vernichten. Zum Vernichten etwaiger Bacillensporen kommt dasselbe dann noch 5 Minuten in 1% Sublimatlösung. Dann wird es herausgenommen und auf reines Fliesspapier gelegt. Wenn die Oberfläche trocken geworden ist, schneidet man mit heissem Messer die bindegewebige Umhüllung ein, reisst das Organ, indem man die Schnittränder mit heissen Pincetten fasst, auseinander und entnimmt aus der Tiefe an diesen Rissflächen das Impfmaterial.

Wie im concreten Falle

**der Gang der Kultur**

sein soll, ergiebt sich aus dem spontanen Vorkommen der Bakterien.

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 386.

[2]) ibid. S. 451.

Bei den saprophytischen Arten, den Pigment- und Fermentbakterien, wird man wohl immer mit Plattenkulturen von Gelatine oder Agar-Agar das Ziel erreichen. Man wird hierbei die kleinen Vortheile, welche eine Massenkultur gewährt, meist vortheilhaft anwenden, besonders auch unter Berücksichtigung der Erhitzung und der Anaerobiose, welche sich auch bei Plattenkulturen verwerthen lässt.

Von den parasitischen Bakterien werden mit grösster Wahrscheinlichkeit diejenigen, bei denen die Epidemiologie einen Fingerzeig giebt, dass sie wahrscheinlich facultative Parasiten oder facultative Saprophyten sind und sich ganz oder unter bestimmten Verhältnissen ausserhalb des thierischen Organismus erhalten können, in Gelatine- oder Agar-Agar-Plattenkulturen rein gewonnen werden können.

Bei den obligat parasitischen Bakterien, wie es in mehr oder weniger hohem Grade die Parasiten der rein contagiösen Krankheiten sind, stehen zur Zeit nur die Blutserumkulturen zu Gebote unter Berücksichtigung der Momente zur Gewinnung eines reinen Ausgangsmaterials.

Für diejenigen Bakterien, welche sich bis jetzt auf festem Nährboden nicht oder nur schlecht gewinnen liessen, wie Spirillen und Spirochäten, und für diejenigen mehr amoeboiden parasitischen Mikroorganismen, welche möglicherweise der einen oder anderen Krankheit zu Grunde liegen können, wird man am besten auf die bis zur Ein-Zell-Kultur getriebene Verdünnungsmethode recurriren, welche zwar erheblich umständlicher und nicht ganz so sicher ist, aber von allen anderen Methoden weitaus am meisten leistet und sogar vorzüglich zu verwerthen ist, wenn man secundäre Momente zu Hülfe nehmen kann, um vorher, wenn auch nicht ganz, so doch leidlich reine Massenkulturen zu gewinnen.

Für andere Mikroorganismen, wie Schimmelpilze, Hefen, lässt sich der feste Nährboden, sowohl in undurchsichtiger Form der Kartoffelscheiben, des Kartoffelbreies und eines dicken Brodbreies verwerthen, als auch in der durchsichtigen Form der Gelatine-, Agar-Agar- und Blutserum-Kulturen. Man hat nur auf die Reaction zu achten und dieselbe in der Regel im Gegensatze zu den Bakterien-

kulturen schwach sauer zu halten und für die Nährsubstrate das spontane Vorkommen in Betracht zu ziehen.

Während man früher in den Reinkulturen nur ein Mittel zum Zwecke einwandsfreier positiver Uebertragungen sah, hatte Koch auf Grund der in den Reinkulturen sich manifestirenden biologischen Eigenschaften erklärt, dass nicht der geringste Grund vorliege, die Aetiologie des Milzbrandes durch eine fortlaufende Anpassung ganz harmloser Schmarotzer an die parasitische Lebensweise zu erklären, sondern dass die Milzbrandbacillen für die Erhaltung der Art gar nicht auf den thierischen Körper angewiesen sind, dass sie ausserhalb des Organismus, wenigstens zeitweilig, alle Lebensbedingungen finden und dass ihr Parasitismus nur ein gelegentlicher ist.[1]) Dann gelang es Koch zum ersten Male, die Parasiten einer rein contagiösen Krankheit, der Tuberkulose, künstlich ausserhalb des thierischen Körpers zu züchten[2]) und Brefeld[3]) entwickelte auf Grund seiner Ermittelungen über das saprophytische Stadium der parasitischen Brandpilze der Cerealien die Ansicht, dass es auch bei den „Parasiten im engsten Sinne" bei Anwendung der richtigen Methoden gelingen dürfte, sie von dem parasitischen Leben wieder abzubringen. Im Anschlusse hieran führte ich aus,[4]) dass jede Reinkultur nichts anderes ist als das saprophytische Stadium parasitischer Mikroorganismen, und ähnlich fasst de Bary[5]) die Fähigkeit des „Gezüchtetwerdens" parasitischer Bakterien in todter organischer Substanz auf.

[1]) Zur Aetiologie des Milzbrandes. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Bd. I, 1881, S. 49.

[2]) Berliner klin. Wochenschrift 1882, No. 15.

[3]) Die künstliche Kultur parasitischer Pilze. Botanische Untersuchungen über Hefenpilze V, 1883, S. 1.

[4]) Fortschritte der Medicin 1884 No. 2, S. 70.

[5]) Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze 1884, S. 526.

## IV. Uebertragungen zum Nachweise der causalen Beziehungen der Bakterienvegetationen zu Zersetzungen und Krankheiten.

### A. Saprophytische Bakterien.

Die zersetzungsfähigen Substrate, Lösungen von Zucker, Glycerin etc., werden nach den Anhaltspunkten hergestellt, welche das spontane Vorkommen an die Hand giebt. Die Einzelheiten der Herstellung sind bei den Kulturen in Flüssigkeiten schon besprochen, ebenso die Methoden des Sterilisirens. Zu den qualitativen Versuchen füllt man die Lösungen in Reagirgläser und kleine Kölbchen, zu den quantitativen Versuchen nimmt man Literkolben und noch grössere Kolben, welche über dem Watteverschluss noch eine Kappe von einer doppelten Lage Filtrirpapier erhalten haben. Will man untersuchen, welchen Grad der Zersetzung die Bakterien spontan herbeiführen, so erhalten die Lösungen keine Zusätze, sollen aber die Substanzen chemisch ausgenutzt werden, so werden entsprechende Zusätze von reinstem kohlensaurem Kalk gemacht um die sich bildenden Säuren in dem Maasse ihres Entstehens sofort zu neutralisiren.

Die Impfungen werden derart vorgenommen, dass man mit einer Platinnadel von einer Reinkultur in Gelatine oder Agar-Agar unter Controle des Mikroskops eine Spur entnimmt und dieselbe unter schnellem Oeffnen in die Lösung bringt. In diesem Falle bringt man nicht nur einen Keim, sondern eine grosse Anzahl derselben Keime ein, welche dadurch sofort in die Lage versetzt werden, etwaige Mitbewerber in der zusagenden Lösung leichter zu unterdrücken. War die Reinkultur durch die Verdünnungsmethode als Ein-Zell-Kultur hergestellt, so überträgt man mit sterilisirten Pipetten die

Volumeneinheit (ein Tropfen, ein Cubikcentimeter) mit dem einen hypothetischen Keime in die sterilisirte Lösung.

Da eine Luftinfection in Flüssigkeiten nicht sofort erkennbar und die bei den Kulturen in Flüssigkeiten und bei den fractionirten Kulturen besprochene Möglichkeit nie ganz auszuschliessen ist, dass irgend ein derartiger zufällig hineingelangter Keim von gewöhnlichen saprophytischen Bakterien alle Anderen überwuchert, muss man bei allen Untersuchungen in Flüssigkeiten eine grössere Zahl Einzelversuche ansetzen. Es empfiehlt sich diese Uebertragungen in einem feucht gehaltenen Glaskasten vorzunehmen.

Eine gewisse Begünstigung des Wachsthums und der Wirkung erfahren wohl alle saprophytischen Bakterien durch Steigerung der Temperatur. Aber das Temperaturoptimum der verschiedenen Arten schwankt und liegt für viele Fermentbakterien ungefähr bei der Bluttemperatur. Man muss deshalb nach der Beschickung der Lösungen einzelne bei Zimmertemperatur, andere bei Brüttemperatur halten, um die zusagende Temperatur in Kürze annähernd zu ermitteln.

Die Controle erfolgt nach drei Richtungen, indem einmal sterilisirte, ungeimpfte Lösungen denselben Aussenbedingungen ausgesetzt werden, zweitens durch das Mikroskop und drittens durch Reinkulturen.

Wenn in den geimpften Lösungen sich für das Auge eine Aenderung bemerkbar macht durch Trübungen, Bakterienwolken, Bakterienhäutchen, Blasenbildung, so wird die Lösung mikroskopisch durch Deckglas-Trockenpräparate geprüft, indem man vorsichtig mit sterilisirten Instrumenten, Platinöse oder Pipette, Proben entnimmt. Man achtet, ob nur ein und dieselbe Form vorhanden ist und ob die Formen identisch sind mit den in den Reinkulturen beobachteten. Kleinere Differenzen können daher rühren, dass die Lösungen den Bakterien mehr zusagen als die Nährgelatine. Dann stellen sich auf der Höhe der Gährungen und noch mehr gegen Ende derselben bisweilen Involutionsformen ein, oder es treten in mehr typischer Weise bei einzelnen Bakterien, besonders den Bacillen, eigenthümliche Erweiterungen ein, welche den Stäbchen eine Wetz-

stein-, Spindel- oder Kaulquappenform verleihen. Wenn solche Erscheinungen beobachtet werden, ist zu ermitteln, ob derartige Formen mit der Gährwirkung, d. h. gesteigerter Function, zusammenhängen, oder ob sie im Gegentheil das erste sichtbare Zeichen der totalen oder partiellen Erschöpfung des Nährbodens sind, ob sie die Sporenbildung vorbereiten, durch welche bei Erschöpfung des Substrates die Erhaltung der Art gesichert wird.

Hierüber gibt das Mikroskop allein keine Auskunft. Man macht deshalb sofort, wenn man derartige Formen sieht, Kulturen, in denen verschiedene Arten sich entwickeln, wenn neben den verimpften fremde Bakterien sich eingeschlichen haben, in denen nur die verimpfte Art auftritt bei wirklich reiner Uebertragung.

Neben dem Temperaturoptimum ist besonders das Sauerstoffoptimum zu beachten. Während viele saprophytische Bakterien, die Erreger der Oxydationsgährungen und die gewöhnlichen aerobiotischen Formen in dieser Hinsicht keine besondere Beachtung beanspruchen und bei Luftzutritt sowohl in Flüssigkeiten als in gelatinirten Lösungen leicht rein gewonnen werden können, zeigen andere Formen eine grössere Intensität des Wachsthums und der Wirkung, wenn die Luft nicht ganz frei zutritt. Bei spontanem Vorkommen haben diese Bakterien eine Neigung zur Hydrobiose, d. h. sie entwickeln sich weniger an der Oberfläche als vielmehr mit Vorliebe im Inneren der Flüssigkeiten. Hier ist der Zutritt von Sauerstoff wohl erschwert, aber es steht den Bakterien immer absorbirter Sauerstoff zu Gebote. Ob das Extrem, welches Pasteur zum Ausgange seiner gährungstheoretischen Betrachtungen machte, die Anaerobiose in der Weise vorkommt, dass der Luftsauerstoff wie ein Gift wirkt, ist sehr zweifelhaft, da bei allen derartigen Experimenten noch andere Factoren mit in's Spiel kommen.

Auch die anaerobiotischen Bakterien kann man mit Gelatine- und Agar-Agar-Kulturen rein gewinnen, weil meist schon eine Beschränkung des Luftzutritts die genügende Intensität des Wachsthums garantirt. Man kann dies erreichen in den dicken Schichten der Reagirglaskulturen und noch besser, wenn man nach

Koch[1]) auf die Gelatine- oder Agar-Agarplatten, wenn die Gelatine eben zu erstarren beginnt, ein dünnes Blatt von Marienglas oder Glimmer auflegt, welches mindestens ein Drittel der Gelatineoberfläche in der Mitte bedeckt. „Das Glimmerblatt legt sich wegen seiner Elasticität vollständig der Gelatinefläche an und sperrt also an der bedeckten Stelle die Luft ab.“ Anaerobiotische Bakterien wachsen auch unter der Glimmerplatte zu Colonien aus, während exquisit aerobiotische unter der Platte nur etwa 2 mm weit gut wachsen, „bis wohin noch eine Diffusion der Luft dringen kann.“ Von den aerobiotischen Bakterien bilden sich unter der Glimmerplatte nur „ganz ausserordentlich kleine, dem blossen Auge nicht sichtbare Colonien, die wahrscheinlich von dem noch in der Gelatine enthaltenen Sauerstoff ihr Dasein gefristet haben, die sich aber nachher nicht weiter vergrössern.“ Man kann auch die geimpften Platten- und Reagirglaskulturen ohne solche Glimmerplatten unter die Glocke der Luftpumpe bringen, oder in Glocken, in welchen die Luft durch Kohlensäure möglichst verdrängt ist.

Auf diese Weise wird es möglich, die Vortheile des festen und durchsichtigen Nährbodens zur Gewinnung von Reinkulturen auch für die anaerobiotischen Bakterien auszunutzen.

Daneben ist es aber nöthig

**Versuche über Anaerobiose in Flüssigkeiten**

zu machen, einerseits um die Zersetzungen bei Abschluss und Beschränkung von Luftsauerstoff zu studiren und dann auch, um mit Hülfe der Anaerobiose durch Massenkulturen die anaerobiotischen Bakterien von den rein aerobiotischen zu trennen, wie dies von Fitz[2]) mit Erfolg geschehen ist, um mit diesem Ausgangsmaterial durch Verdünnung Ein-Zell-Kulturen zu gewinnen.

Die Versuchsanordnungen über Anaerobiose lassen sich eintheilen in solche, bei denen a) nur die Luft ausgetrieben, und

---

[1]) Conferenz zur Erörterung der Cholerafrage. Berl. klin. Wochenschrift 1884, No. 31 ff., und deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 32 ff.

[2]) Ueber Spaltpilzgährungen IX. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, XVII. Bd., 1884, S. 1188.

b) in solche, bei denen die Luft durch andere Gase ersetzt wird. Das Verdrängen der Luft kann durch Auskochen geschehen; dann muss es möglich sein, nach der Abkühlung die Impfung derart auszuführen, dass beim Impfen keine Luft eindringen kann. Oder die Impfung der Lösungen mit Gelatinereinkultur oder Ein-Zell-Kultur erfolgt vor dem Verdrängen der Luft; dann muss das Austreiben der Luft bei einer Temperatur vorgenommen werden, welche auf die Bakterien nicht schädigend wirken kann. Vortheilhaft ist es schon im ersten, nothwendig im zweiten Falle, dass die zu impfenden Lösungen vorher sicher sterilisirt sind.

Die einfachste, zur Orientirung und zu Massenkulturen ausreichende Versuchsanordnung besteht darin, dass man ein Kölbchen, a in Fig. 22, mit langem Halse zur Hälfte mit dem noch unreinen, auf Anwesenheit von anaerobiotischen Organismen zu prüfenden Bakteriengemische oder mit der sterilisirten und geimpften Lösung füllt. Dann zieht man den Hals bei b an der Gaslampe eng aus und verbindet das offene Ende c mit einem Aspirator oder einer Luftpumpe. Während des Verdünnens der Luft kommt das Kölbchen a in ein Wasserbad von 38 bis 40°, in dem es unter heftigem Sieden ca. $^1/_2$ Stunde bleibt. Dann wird während des Saugens der Hals bei b mit einer spitzen Flamme zugeschmolzen.

Fig. 22.

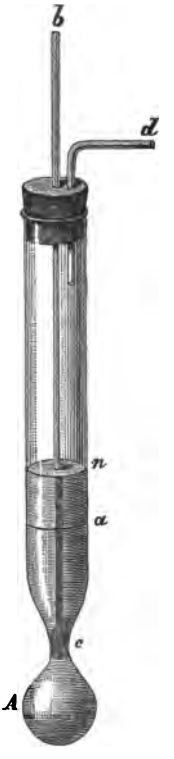
Man erhält auf diese Weise ganz luftleere Wasserhammer, welche kräftig an die Wand anschlagen, und in denen die Flüssigkeit durch Körperwärme zum Sieden kommt. Je nach dem Material werden diese Kölbchen bei Zimmer- oder Brüttemperatur gehalten.

Nach Nencki[1]) kann man in folgender Weise verfahren, Fig. 23. Das Gefäss wird bis zur Höhe a mit dem Bakteriengemische oder der geimpften Lösung gefüllt und darauf mit dem doppelt durchbohrten Kautschukpfropf verschlossen. Durch die eine Oeffnung dieses Pfropfs geht ein Glasstab b, welcher in einem eingeschliffenen Stöpsel endet, der gut in die Verjüngung c passt, so dass der Inhalt der Kugel A von der oberen Flüssigkeit vollständig abgeschlossen

[1]) Beiträge zur Biologie der Spaltpilze 1880.

werden kann. In der zweiten Oeffnung befindet sich das rechtwinklig gebogene Rohr d, dessen Ende mit der Luftpumpe verbunden wird. Während des Saugens befindet sich die Kugel A im Wasserbade und der Glasstab b wird soweit herausgezogen, dass der Stöpsel sich ungefähr bei a befindet. „Sobald die Luft entfernt ist, was man an dem stossweisen Aufkochen und Anschlagen der Flüssigkeit an die Wände des Gefässes erkennt, wird durch vorsichtiges Drehen der Glasstab hinuntergedrückt, bis durch den Stöpsel die in der Kugel A befindliche Flüssigkeit hermetisch abgeschlossen ist. Sodann wird während des Aspirirens mittelst einer spitzen Flamme bei d das Rohr zugeschmolzen und nach dem Erkalten das zugeschmolzene Ende in einer concentrirten, soeben bereiteten alkalischen Pyrogallollösung abgebrochen. Nachdem hinreichend, bis etwa zu der Höhe n Pyrogallollösung eingetreten ist, wurde das Rohr d von Neuem zugeschmolzen.“ Die alkalische Pyrogallollösung dient als Index für die Zuverlässigkeit des Verschlusses: „die hinzutretende Luft würde die klare, gelbbräunliche Lösung sofort dunkel gefärbt haben.“

Fig. 23.




Bei diesen Versuchen ist für das Entweichen der Gase keine Fürsorge getroffen. Pasteur[1]) versuchte dies auf folgende Weise zu erreichen; Fig. 24 und Fig. 25. Ein Kolben von der Form der Fig. 24 wird mit der Lösung gefüllt, das Ableitungsrohr taucht in eine mit derselben Lösung gefüllte Porzellanschale. Die Flüssigkeit im Kolben und die der Porzellanschale werden gleichzeitig etwa eine halbe Stunde gekocht, um alle Luft resp. den Luftsauerstoff aus der Flüssigkeit zu vertreiben. Durch den sich entwickelnden Dampf wird die Flüssigkeit aus dem Ballon herausgetrieben, aber es steigt dann wieder durch Kochen luftleer gemachte Flüssigkeit aus der Porzellanschale in den Kolben zurück; dies wiederholt sich während

[1]) Études sur la bière 1876, S. 229 ff. Des rapports de l'oxygène avec la levure.

der Dauer des Kochens einige Mal. Dann lässt man abkühlen. Während des Abkühlens habe ich es vortheilhaft gefunden die Flüssigkeit in der Porzellanschale mit einer Schicht von vorher durch einstündiges Kochen sterilisirtem Oel zu bedecken, um eine nachträgliche Absorption von Sauerstoff möglichst zu verhindern. Nach vollständigem Abkühlen bringt man das Ableitungsrohr zum Auffangen sich bildender Gase unter sterilisitres Quecksilber und stellt den ganzen Apparat in den Brütofen. Zur Controle wendet Pasteur Kolben an, Fig. 25, von der doppelten Grösse, welche nur zur Hälfte gefüllt werden, so dass reichlich Sauerstoff zu Gebote steht. Zum Impfen des Kolbens, Fig. 24, kann man sich der früheren Methoden nicht bedienen. Man bringt deshalb in frischer Gährung befindliche Lösung in den Ansatz über dem Glashahn, der vorzüglich schliessen muss. Nach dem Abkühlen lässt man unter schnellem Oeffnen und Wiederschliessen des Hahns einige Tropfen der in Gährung befindlichen Lösung in den Kolben übertreten. Statt einer in Gährung befindlichen Lösung, halte ich es für besser, eine Suspension der Reinkulturen in sterilisirtem, luftfreiem, destillirtem Wasser in den kleinen Recipienten zu bringen.

Fig. 24.

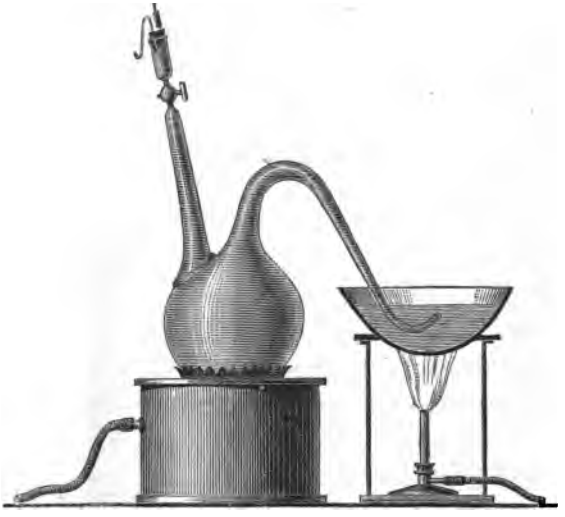


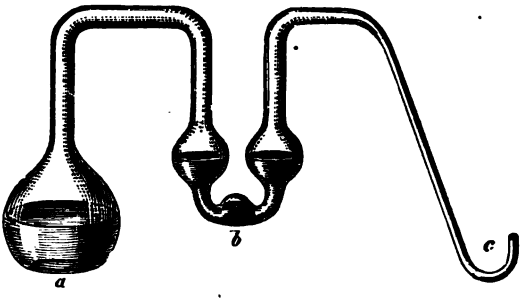
Fig. 25.

Um den Stoffwechselproducten der Bakterien das Entweichen zu gestatten und jeden Kautschukverschluss zu vermeiden, wählte Nencki l. c. folgende Anordnung, Fig. 26.

Das an 3 bis 4 Stellen verjüngt ausgezogene Ableitungsrohr c taucht in die auf Anwesenheit anaerobiotischer Mikroorganismen zu prüfende oder mit Reinkulturen geimpfte, sterilisirte Flüssigkeit, während gleichzeitig der Liter-Kolben a durch Erwärmen luftleer gemacht wird. In Folge dessen wird die Flüssigkeit in den Apparat aspirirt, der etwa zu $^2/_3$ des Kolbens a gefüllt wird.

Darauf wird das Ende von c mit der Luftpumpe verbunden und während der Kolben a im Wasserbade sich befindet, der ganze Apparat wie früher (Text zu Fig. 22 und 23) luftleer gemacht. Während des Saugens wird das Rohr c an einer Verjüngung zugeschmolzen. Das zugeschmolzene Ende wird darauf in reinem Kohlensäure- oder Stickstoffgas abgebrochen und dadurch der Apparat mit diesem Gase gefüllt und das Ende c von Neuem zugeschmolzen. Das zugeschmolzene Ende wird dann wiederum in alkalischer, concentrirter Pyrogallollösung abgebrochen, durch Erwärmen des Apparats ein Theil des Gases herausgetrieben, bis die beiden Kugeln des U-förmigen Rohres b etwa zur Hälfte mit der Pyrogallollösung gefüllt sind. Dann lässt man das Ende von c in Quecksilber tauchen und bringt den ganzen Apparat in einen Thermostaten.

Fig. 26.



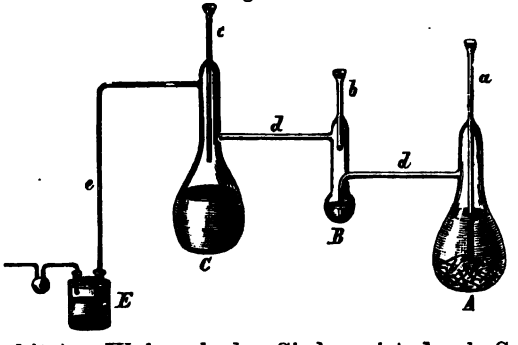

Gunning[1]) hatte den früher gewählten Versuchsanordnungen gegenüber geltend gemacht, dass die gebräuchlichen Abschlüsse gegen die Luft, wie Glashähne, Quecksilber, Pyrogallollösung, keine volle Sicherheit bieten, da er durch das nach seiner Ansicht empfindlichste Reagens auf Sauerstoff, das weisse Ferroferrocyanür, die Anwesenheit von Sauerstoff glaubte nachweisen zu können.

[1]) Journal f. pract. Chemie, N. F., Bd. XX, 1879, S. 434.

Nencki und Lachowicz[1]) wählten deshalb folgende Versuchsanordnung, Fig. 27. Der Apparat besteht aus zwei Kölbchen, A und C, von ca. 250 cm und einem Kölbchen B von etwa 50 cm Inhalt.

Das Kölbchen A dient zur Entwickelung von Wasserstoff aus Eisen und Schwefelsäure und zur Bildung von eisenoxydfreiem schwefelsaurem Eisenoxydulsalz; vor Einschmelzen des Trichterröhrchens a werden deshalb mehrere Rollen Klavierdraht in A eingebracht. B dient zur Aufnahme von ca. 10 ccm Blutlaugensalzlösung und zur Entwickelung des weissen Ferroferrocyanür. C enthält die Nährlösung. Die Kolben werden sorgfältig gereinigt oder besser noch sterilisirt und durch Hitze getrocknet und dann bei d zusammengeschmolzen. Darauf wird A zu $^2/_3$ mit destillirtem Wasser gefüllt, mit einigen Tropfen concentrirter Schwefelsäure angesäuert und zum Kochen erhitzt. Während des Siedens ist durch Schrägstellung des Apparates Sorge zu tragen, dass die im Röhrchen d zwischen A und B condensirten Dämpfe in den Kolben A zurückfliessen, weil sonst mit den Wasserdämpfen Eisenoxydtheilchen in das Kölbchen B hineingerissen werden können. „Hat das Wasser einige Minuten gekocht, so lässt man es auf 60 bis 50° erkalten und giesst durch das Trichterröhrchen a von Zeit zu Zeit in kleinen Portionen gut ausgekochte etwa 30 bis 40 % ige Schwefelsäure ein, wodurch ein gleichmässiger, rascher und viele Stunden andauernder Strom von Wasserstoffgas erzeugt wird. Jetzt werden einige frisch auskrystallisirte Krystalle von Ferrocyankalium in ausgekochtem Wasser gelöst und einige Cubikcentimeter davon durch das Trichterröhrchen b in das Kölbchen B hineingegossen. Während Wasserstoff etwa

Fig. 27.




[1]) Die Anaerobiosefrage. Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. XXXIII, 1883

eine Viertelstunde lang durch die Ferrocyankaliumlösung streicht, wird der Kolben C mit der (sterilisirten) Nährlösung zu etwa $^2/_3$ des Inhalts gefüllt und sodann das Kölbchen B bei b zugeschmolzen. Jetzt wird die Flüssigkeit in dem Kolben C 10 bis 15 Minuten lang im Sieden erhalten, hierauf die Flamme entfernt und noch, während die Flüssigkeit kocht, das Ableitungsrohr e mittelst des in dem Gefässe E befindlichen Quecksilbers abgesperrt." Das Quecksilber ist mit einer Schicht von alkalischer Pyrogallollösung und diese mit einer Schicht Oel oder anderer in Wasser unlöslichen Flüssigkeit bedeckt. Das Trichterröhrchen c wird nun mit einem Wachspfropf verschlossen, damit das Wasserstoffgas durch den Quecksilberverschluss in E entweicht und so alle Luft aus diesem Theile des Apparates verdrängt. Wenn die Nährlösung in C auf ca. 30° abgekühlt ist, lüftet man den Wachspfropf und inficirt die Nährlösung mit einigen Tropfen des zu prüfenden Bakteriengemischs oder der in sterilisirtem Wasser suspendirten Reinkultur, trocknet den Hals bei c mit Löschpapier und schmilzt zu. Um auch das Röhrchen a mit Wasserstoffgas zu füllen, bringt man in dasselbe etwas Eisendraht und schmilzt auch dieses Röhrchen bei a zu. Jetzt ist im ganzen Apparate die Luft durch Wasserstoffgas ersetzt. „Auf diese Weise geschieht die ganze Beschickung des Apparates im Wasserstoffstrome und die Entwickelung des Gases dauert noch einige Stunden nachdem alle Eingussröhrchen zugeschmolzen sind. Durch Neigung des Apparates wird dann etwas von der Eisenoxydullösung aus A in B hineingegossen. Der jetzt entstandene Niederschlag von Ferroferrocyanür ($Fe_2[FeCy_6]$) ist vollkommen weiss und ändert auch nach längerem Stehen seine Farbe nicht."

Da die Frage der Anaerobiose noch keineswegs nach allen Richtungen hin erledigt ist, kann zum Anhalt über die Richtung der Forschung dienen, dass, während Pasteur, Nencki und die meisten Forscher die Anaerobiose als erwiesene Thatsache ansehen, Gunning dieselbe ganz leugnet und als Phantasie bezeichnet. Es ist bei den Versuchen deshalb in erster Linie erforderlich, dass nicht einfache Hydrobiose als Anaerobiose angesehen wird, sondern besondere Versuche ad hoc unternommen werden. Wenn die Anaerobiose erwiesen ist, ist zu ermitteln, ob dieselbe die Ursache der

Zersetzung ist (Pasteur) oder ob dieselbe für den Verlauf der Zersetzung eine mehr nebensächliche Bedeutung hat, wie mir die ganze Frage unter Anerkennung der Möglichkeit der Anaerobiose zu liegen scheint.[1])

## B. Parasitische Bakterien.

Durch die Uebertragungen von Reinkulturen auf empfängliche Thiere (cfr. Infectionsmethode S. 98) wird direct der Nachweis geführt, dass die bei einem Krankheitsprocesse vorkommenden Mikroorganismen wirklich die conditio sine qua non der betreffenden Infectionskrankheit sind. Die indirecten Methoden zur Erforschung der Aetiologie, auch die experimentell arbeitende localistische Forschung, kommen alle nur bis zu diesem Punkte. Hier ist vorläufig ihren Methoden ein Ziel gesetzt. Auch die mit grossen Zahlen arbeitende Statistik muss hier Halt machen, ganz abgesehen davon, dass bei der Verwerthung auch grosser Zahlen der Werth der Schlüsse sehr davon abhängt wie die Zahlen gewonnen wurden, so dass dasselbe Zahlenmaterial wiederholt schon mit derselben Entschiedenheit bald für Grundwassertheorie bald für Trinkwassertheorie, bald zur Erklärung einer Krankheit als contagiöser Natur bald als Bodenkrankheit herangezogen worden ist.

Es würde nichts Verkehrteres geben als die Bedeutung der auf das Studium der Hilfsursachen gerichteten ätiologischen Forschung, welche gerade für das praktische Handeln bei Versagen anderer Angriffspunkte oft brauchbare Anhaltspunkte giebt, herabzusetzen. Aber ebenso unrichtig ist es die Ergebnisse dieser Richtung als die allein maassgebenden hinzustellen und das Thierexperiment als nichts beweisend für die natürliche Art der Infection anzusehen. Es dürfte gut sein, wenn man sich auch hin und wieder einmal der oft recht grossen Schwächen der Methoden erinnert, mit denen die indirecte Forschung in der Aetiologie arbeiten muss, bei denen die

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. II., 1884, S. 345, und Ueber die Zersetzungen der Milch und die biologischen Grundlagen der Gährungsphysiologie. Deutsche med. Wochenschrift 1883, No. 48 bis 50.

Sicherheit der daraus gezogenen Schlüsse oft recht grell contrastirt mit der Unsicherheit des Beobachtungsmaterials.

Aber auch bei den Thierexperimenten hat man sich vor Einseitigkeiten zu hüten. Der Experimentator, welcher im Besitze empfänglicher Thiere das Experiment vollständig beherrscht, verfällt leicht in den Fehler zu einseitig contagionistisch zu denken und aus seinen directen Erfolgen für den natürlichen Infectionsmodus zu viel zu schliessen.

Die Aufgabe des Thierexperimentes ist aber in Wirklichkeit eine zweifache, wobei allerdings eine strenge Scheidung kaum durchführbar ist. Einmal ist überhaupt durch directe Uebertragungsversuche zu ermitteln ob eine Bakterienart pathogen ist oder nicht, ob sie die Ursache einer Krankheit oder ein zufälliger Begleiter ist. Durch diese Versuche ist gleichzeitig zu ermitteln ob die Bakterien bei der künstlichen Infection sich ebenso wie bei der spontanen Erkrankung im Körper in einer Verbreitung und Anordnung vorfinden, welche alle klinischen Symptome und pathologischen Befunde zwanglos erklärt. Zweitens ist zu versuchen den Modus der Insection möglichst zu erreichen, den wir aus klinischen, pathologisch-anatomischen und allgemein epidemiologischen Ermittelungen als den Modus der natürlichen Infection bei spontanem Eintritt einer epidemischen Krankheit annehmen. Man kann folgende Methoden zur Infection anwenden.

### Die Inhalationsversuche

stellt man derart an, dass man die Thiere in einen geräumigen Kasten bringt, dessen Luft Organismen beigemengt worden. Dies geschieht durch einen Dampfzerstäubungs-Apparat, oder weniger bequem durch einen Hand-Spray. Man lässt entweder den Apparat kürzere Zeit, 20 Minuten bis 1 Stunde, wirken und verwendet dann eine stärkere Suspension von Reinkulturen in sterilisirtem Wasser, oder man lässt die Zerstäubung länger andauern und vertheilt dann die Bakterien in entsprechend grösseren Wassermengen.

Da bei der natürlichen Infection durch die Athmung die Dauerkeime wahrscheinlich eine grosse Rolle spielen, wird hierauf in den Experimenten Rücksicht zu nehmen sein, und manche der Differenzen über Erfolg und Nichterfolg bei der Inhalationstuberkulose durch tuberkulöse Sputa sind wohl hierauf mit zurückzuführen. Nach Veraguth[1]) verreibt man 10 gr eitriges tuberkulöses Sputum mit der 50fachen Menge Wasser, filtrirt diese Suspension zur Entfernung von Beimengungen, welche an und für sich eine mechanische oder chemische Reizung des Lungengewebes verursachen könnten, durch zwei dichte Flannelllappen oder nach Weichselbaum[2]) durch entfettete Baumwolle.

Bei Inhalation durch Trachealfisteln ist auf die Möglichkeit der gleichzeitigen Infection von der Wunde aus zu achten.

Will man sehen, welche Wirkungen Bakterien ausüben, welche auf irgend eine Weise in die Trachea gelangt sind, so kann man nach Küssner[3]) unter antiseptischen Cautelen die Trachea durch einen kleinen Schnitt freilegen und das Material durch eine feine Oeffnung mittelst einer Spritze in die Trachea bringen.

### Aufnahme mit der Nahrung; Fütterungsversuche.

Bei der künstlichen Infection durch Fütterung muss man ausschliessen, dass durch rauhes, stachliges Futter möglicherweise Verletzungen der Schleimhäute eintreten können. Eine Infection von einer derartigen verletzten Stelle aus ist als eine Wundinfection in ihrem ganzen Effecte sowohl als in der Bedeutung für die Aetiologie des spontanen Entstehens anders aufzufassen als die Aufnahme von Infectionsmaterial durch die Nahrung ohne Verletzung der Schleimhäute.

Nach Koch, Gaffky, Löffler[4]) erreicht man, wenigstens bei grösserrn Thieren, den Zweck am sichersten, wenn man von kleinen frischen Kartoffelwürfeln eine dünne Schicht so weit ab-

[1]) Experimentelle Untersuchungen über Inhalations-Tuberkulose. Arch. f. experim. Pathologie 1883, Bd. 17.

[2]) Wiener med. Jahrbücher 1883.

[3]) Beitrag zur Impftuberkulose. Deutsche med. Wochenschrift 1883, Nr. 36.

[4]) Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1884, Bd. II, S. 166.

spaltet, dass man sie deckelartig aufklappen kann. Dann höhlt man das Innere aus und füllt es mit dem rein kultivirten Bakterienmaterial, klappt den Deckel zu und bringt das präparirte Kartoffelstück auf die hintere Parthie der Zunge, so dass es ungekaut verschluckt werden muss. Kleine Würfel von hartgekochtem Eiweiss etc. kann man ebenso präpariren. Das Bakterienmaterial kommt dann bei Ausschluss jeder Verletzung der Schleimhäute in den Magen. Die bisherigen Versuche lehren, dass frische, sporenfreie Bakterien in der Regel durch die Säure des Magensaftes vernichtet werden und nicht inficiren. Man muss deshalb die Versuche mit sporenfreiem und sporenhaltigem Material anstellen.

Da bei Magen-Darmkatarrhen eine Infection leichter einzutreten scheint, zum mindesten nach den Versuchen eine Begünstigung der Infection durch alle die Momente erwartet werden kann, welche der Säurebildung im Magen direct oder indirect entgegenwirken, kann man versuchen bei Bakterien, welche keine Sporen bilden, der hemmenden Wirkung des Magensaftes dadurch zu begegnen, dass man vor dem Verfüttern des bakterienhaltigen Materials durch Drastica künstlich Magen-Darmkatarrh erregt oder dass man nach Nicati und Rietsch[1]) die Bakterien direct in das Duodenum injicirt. Diese Operation wird unter antiseptischen Cautelen mit sterilisirten und wieder abgekühlten Instrumenten, mit im Dampfe sterilisirter Watte und Seide ausgeführt. Das aufgebundene Thier wird mit einem Bogen durch Dampf sterilisirten Gummipapiers bedeckt, welches nur über der Operationsstelle eine Oeffnung hat. Die in dieser Oeffnung zu Tage liegende, in genügender Ausdehnung von den Haaren befreite und abgeseifte Bauchhaut wird mit 1% Sublimatlösung gründlich abgewaschen, dann wird das Sublimat durch sterilisirtes Wasser wieder entfernt. Der Schnitt wird in der linea alba etwas unterhalb des proc. xiphoideus angelegt. Nach Eröffnung des Peritoneum findet man schnell das Pylorusende des Magens, verfolgt dasselbe dem Netze entlang bis zum Duodenum. Dieses wird dann mit Pincette fixirt und in der Längsrichtung desselben die von Koch

[1]) Semaine méd. 1884, No. 38. Vergl. auch Deneke, deutsche med. Wochenschrift 1885, No. 3.

modificirte, sterilisirte Pravaz'sche Spritze eingestochen und der Inhalt so injicirt, dass nichts in die Bauchhöhle gelangt. Ueber die Herrichtung der Spritze cfr. subcutane Injection. Dann wird das Duodenum in die Bauchhöhle reponirt, die Wunde durch dichte Nähte vereinigt und Jodoform eingestreut. Ein weiterer Verband ist überflüssig.

Da eine Infection nicht nur durch die mit der festen Nahrung aufgenommenen Bakterien möglich ist, sondern auch durch die flüssige Nahrung, wie Wasser, Milch, so wird man in manchen Fällen die Reinkulturen besser in sterilisirtes Wasser oder Milch einbringen, die als Getränk dienen.

Experimentell besser beherrschbar als die Aufnahme durch Athmung und Nährung ist die Infection durch Verletzungen, welche strenggenommen nur für die eigentlichen Wundinfectionskrankheiten verwerthet werden sollte. Diese Methoden haben sich wegen der Sicherheit und Brauchbarkeit zur Entscheidung vieler pathologischer Fragen ganz allgemein Eingang verschafft selbst dort, wo durch dieselben der Modus der spontanen Infection nicht genau nachgeahmt wird.

**Die cutane Impfung**

besteht in einer Verletzung der Oberhaut ohne Verletzung des subcutanen Gewebes, mit nachträglicher oder gleichzeitiger Application des Infectionsstoffes. Man bringt mit einem sterilisirten Messer eine leichte Verletzung der vorher von den Haaren entblössten Oberhaut an und streicht in diese flache Wunde mit einem Messer oder Platindraht eine Spur der Reinkultur oder der bakterienhaltigen Flüssigkeit ein. Statt dieses Operirens in zwei Zeiten kann man auch das Messer erst in die Reinkultur tauchen und den Schnitt gleich mit dem inficirten Messer machen.

Man wählt solche Stellen, an welchen die Thiere die Wunde nicht lecken können und welche ausserdem gestatten, den Process möglichst sichtbar zu verfolgen. Hierzu eignet sich vorzüglich das Ohr. Man macht an der inneren Fläche nicht weit von der Spitze oder an der vorderen Wurzel in die freie den Knorpelrand begren-

zende Haut einen nur wenige Millimeter tiefen, nicht blutenden Schnitt. Bei Mäusen gelingt fast nur an der Ohrwurzel und auch da noch schwer genug eine rein cutane Verletzung.

Auch die Impfungen der durchsichtigen Hornhaut, welche von Nassiloff[1]) und Eberth[2]) eingeführt wurden, kann man hierher rechnen. Man macht vom Hornhautrande her einen flachen Einstich in die Hornhaut, von dem aus die Bakterien in die Hornhaut in der sternartigen Form der sogenannten Pilzfigur hineinwuchern.

Auseinanderzuhalten von der ächten cutanen Impfung ist die

**subcutane Application**

der Bakterien. Man schneidet an einer von Haaren befreiten, gegen Lecken sicheren Stelle eine mit der Pincette erhobene Hautfalte am Grunde ein und bildet mit stumpfer Sonde oder dem Messer eine Hauttasche. In diese Hauttasche streicht man mit sterilisirtem Messer oder Platinnadel von der Reinkultur ein und drückt dann die Haut wieder fest an. Bei Mäusen operirt man nach Koch[3]) am bequemsten derart, dass man die in einem grossen verdeckten Glascylinder sitzende Maus mit einer langen Pincette am Schwanze fasst und den letzteren aus einem schmalen, für die Maus selbst nicht passirbaren Spalt zwischen Deckel und Glasrande soweit hervorzieht, dass man ihn mit der linken Hand gut fassen kann. Dann macht man mit der Scheere in die verschiebbare Haut an der Schwanzwurzel einen flachen, quer verlaufenden Einschnitt, in den man mit einem Messer eine Spur der Reinkultur einstreicht.

Zur subcutanen Injection dient eine von Koch[4]) angegebene, modificirte Pravaz'sche Spritze, welche durch Hitze sicher sterilisirt werden kann und deshalb ohne Kautschuk hergestellt ist. Die Metallfassung ist mit dem Glascylinder durch ein in das Glas eingeschliffenes Schraubengewinde verbunden und diese Verbindung

---

1) Virchow's Archiv Bd. 50, S. 550.

2) Bakterische Mykosen 1872.

3) Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit. Beiträge zur Biologie der Pflanzen II. Bd., 2. Heft, 1876, S. 279.

4) Mittheilungen I. 1881, S. 17.

wird dicht gemacht durch ein kleines Korkplättchen, welches öfters erneuert wird. Der Stempel der Spritze wird mit Watte und Seidenfaden jedesmal frisch umwickelt, bis er fest schliesst. Die so hergerichtete Spritze wird 2 Stunden bei 150 bis 160° im Trockenschranke gehalten und gegen Staub geschützt abgekühlt. Vor dem Gebrauche wird der Stempel durch frisch sterilisirtes destillirtes Wasser angefeuchtet. Zum Injiciren dienen frisch hergestellte Suspensionen der rein kultivirten Bakterien in sterilisirtem Wasser.

Von Wichtigkeit kann auch das Einbringen von Bakterien in die vordere Augenkammer werden, besonders bei Arten, welche so langsam wachsen, dass die ersten sichtbaren Effecte in der Iris sich einstellen, wenn alle Entzündungserscheinungen schon beseitigt sind. Cohnheim und Salomonsen[1]) führten diese Methode für die Tuberkulose ein. Die Technik ist dieselbe wie bei der Iridectomie. Die linke Hand fasst mit einer Fixirpincette eine Falte der Conjunctiva und dreht mit derselben den Augapfel zur Seite. Die andere Hand sticht das schief nach Innen gerichtete Lanzenmesser dicht am Rande der Hornhaut ein. Sobald die Spitze in der vorderen Kammer angelangt ist senkt man den Stiel so, dass die Spitze gegen die Hornhaut gerichtet ist. In dieser Weise muss auch das Messer, sobald der Schnitt genügend gross ist, zurückgezogen werden, damit nicht wegen des abfliessenden Kammerwassers die nach vorn dringende Iris und Linse verletzt werden. Reinkulturen kann man mit der Spitze einführen, während man kleine Partikel bakterienhaltigen Materials mit einer Irispincette einbringt.

**Zur directen Injection in die Blutbahn**

wird das Gefäss (meist v. jugularis oder cruralis) unter antiseptischen Cautelen blosgelegt und die Canäle der Koch'schen Spritze eingebunden wie die Haarröhrchen nach Salomonsen S. 97, aber so, dass möglichst wenig Blut ausfliesst. Die Unterbindung des verletzten Gefässes erfolgt in der gewöhnlichen Weise der Chirurgie, ebenso die Schliessung der Hautwunde.

---

[1]) Sitzungsberichte der Schlesischen Gesellschaft für vaterländische Cultur vom 13. Juli 1877 und Salomonsen: Om Indpodning af Tuberkulose, särligt i Kaninens Iris. Nordiskt Medicinskt Arkiv 1879, Bd. XI, No. 12 u. 19.

Will oder kann man keine Uebertragungen mit Reinkulturen machen, sondern will man von Thier zu Thier impfen, so bleibt die Technik dieselbe, nur hat man bei der Entnahme des Materials so sorgfältig zu verfahren, als wollte man es zur Herstellung von Blutserum-Reinkulturen benutzen.

Wenn die malignen Eigenschaften einer reinkultivirten Bakterienart festgestellt sind, ist es wünschenswerth annäherend die Minimalzahl der Bakterien zu kennen, welche eben zur sicheren Infection ausreichen. Oder bei nachgewiesener Virulenz einer infectiösen Flüssigkeit, des Blutes z. B., ist es es wünschenswerth zu wissen, in welchem Grade der Verdünnung eine bestimmte Zahl Tropfen noch sicher inficirt. Aus derartigen Versuchen kann man fast unmittelbare Schlüsse für den Modus der natürlichen Infection ziehen. Bis jetzt liegen nach dieser Richtung nur ganz allgemeine Anhaltspunkte vor, welche nach Koch ergeben, dass die unbedingt zur Infection erforderliche minimale Zahl der Bakterien bei verschiedenen Infectionskrankheiten schwankt und dass dieses Minimum in Beziehungen zur Körpergrösse der Thiere steht. Nur für eine Form der Septikaemie ist diesem Postulate durch Davaine[1]), Koch[2]) und Gaffky[3]) eingehend Rechnung getragen.

Für die Pflanzenpathologie haben die Bakterien bis jetzt nur wenig Bedeutung gewonnen, vielleicht wegen der meist sauren Reaction der Pflanzengewebe. Reinke und Berthold[4]) gelang es, mit bakterienhaltiger Flüssigkeit aus einer nassfaulen Kartoffel gesunde Kartoffeln zu inficiren. Da die intacte Korkschicht einer gesunden Kartoffel vor der Infection schützt, muss man die Korkschicht durchtrennen. Man schneidet zu diesem Zwecke eine dreiseitige Pyramide mit scharfem Messer aus, bringt in diese Wunde ein Tröpfchen der Flüssigkeit oder eine Spur der Reinkultur und setzt

---

[1]) Bulletin de l'Académie de médecine, Sitzung vom 17. Sept. 1872.

[2]) Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten 1878.

[3]) Experimentell erzeugte Septicaemie mit Rücksicht auf progressive Virulenz und accomodative Züchtung. Mittheilungen a. d. Kais. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 50.

[4]) Unters. aus dem botan. Laborat. in Göttingen, Heft I.

das herausgeschnittene Stück wieder ein. Die geimpften Knollen kommen dann in eine feuchte Kammer. Nach Wakker[1]) ist die in Holland beobachtete sog. gelbe Krankheit der Hyacinthe durch Bakterien bedingt, welche als gelbe schleimige Masse in den Gefässen der Zwiebeln und in den Gefässen und dem Parenchym der Blätter sich finden. Der directe Nachweis, dass diese beobachteten Bakterien die Ursache der Krankheit sind, würde noch durch Uebertragung auf gesunde Pflanzen zu bringen sein.

[1]) Botan. Centralblatt Bd. 14, S. 315.

## V. Allgemeine biologische Aufgaben.

Nachdem durch Uebertragen der Nachweis geliefert ist, dass die bei einer Zersetzung oder Krankheit beobachteten Bakterien die Ursache dieser Vorgänge sind, muss ermittelt werden ob eine saprophytische Art nur diese eine Zersetzung oder Fermentation ausübt, oder ob sie in andern Medien anders wirkt; so verursachen z. B. die Buttersäurebacillen in Saccharaten Buttersäuregährung, während sie aus Glycerin, nach Fitz, Propylalkohol als Hauptproduct bilden. Weiter ist zu beachten, dass Fermentbakterien auf bestimmten Substraten characteristische Pigmente bilden, oder dass sie auf bestimmte Thiere pathogenetisch wirken können. Nach Brieger tödten z. B. bestimmte Bacillen, welche in Saccharaten Propionsäuregährung hervorrufen, Meerschweinchen. Es ist demnach durch möglichst grosse Variation der Nährsubstrate und durch Uebertragungen auf verschiedene Thierspecies zu ermitteln, ob die saprophytischen Bakterien, und speciell die Ferment- und Pigmentbakterien nur eine einzige Zersetzung erregen, oder ob sie in verschiedenen Substraten verschiedene Zersetzungen erregen, ob sie Pigmente bilden, oder ob sie auch parasitischer Lebensweise fähig sind.[1])

Bei parasitischen Bakterien ist zu ermitteln, ob sie nur für die eine Thierspecies maligne Eigenschaften enthalten, bei der sie spontan beobachtet wurden, oder ob sie auch für andere Thiere pathogenetisch sind. Die Beantwortung dieser Frage ist höchst wichtig

[1]) cfr. über diese Möglichkeiten: Fitz, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1882, S. 867, 1884, S. 1188 und meine Angaben in der deutschen med. Wochenschrift 1884, No. 48 bis 50.

zur Ermittlung der Verbreitungsmöglichkeiten einer Infectionskrankheit. Auch die Reinkulturen der infectiösen Bakterien sind auf verschiedene Substrate zu übertragen, da sie möglicherweise Substrate, auf denen sie zu leben vermögen, in einer mehr typischen Weise zersetzen können. Die Bacillen des Rotz und die Vibrionen der Cholera asiatica z. B. bewirken auf einzelnen Substraten die Bildung eines braunen Pigments und die Kokken der Osteomyelitis bewirken Milchsäuregährung und rufen ein gelbes Pigment hervor.[1])

Die Herstellung der Substrate und die Uebertragung auf dieselben und auf Thiere erfolgt in der früher angegebenen Weise. Besonders ist hierbei zu achten, ob sich mit Aenderung des Substrates die Form in irgend einer Weise ändert oder neue Formen auftreten. Durch Herstellung von Reinkulturen ist jedesmal eine sorgfältige Controle der Uebertragungen zu machen, sobald irgend welche Eigenthümlichkeiten beobachtet werden.

Mit Hülfe der Reinkulturen ist zu ermitteln, ob die Bakterien ihren Stickstoffbedarf nur aus Albuminaten, ihren Kohlenstoffbedarf nur aus Zucker zu befriedigen vermögen, oder ob sie ihn einfacheren Verbindungen entnehmen können. Die Zusammensetzung solcher Lösungen und die Variation der Mineralbestandtheile erfolgt nach Kap. III, S. 71.

Vermögen die Bakterien feste Albuminate, hartgekochtes Fibrin, geronnenes Caseïn zu lösen, zu peptonisiren?

Durch Säure frisch gefälltes Caseïn wird bis zur Entfernung der sauren Reaction mit destillirtem Wasser gewaschen; ebenso wird frisch gewonnenes Fibrin gründlich ausgewaschen. Am besten macht man drei Parallelversuche, indem man in einige Reagirgläser nur ein Bröckchen Caseïn oder eine Fibrinflocke resp. einen Würfel Hühnereiweiss mit destillirtem Wasser bringt; in andere Gläser kommt ein Zusatz von 0,1 % Fleischextract und in eine dritte Reihe Gläser noch ausserdem 0,5 % Traubenzucker. Die Gläser werden erst

[1]) cfr. über diese Möglichkeiten meine Angaben in der deutschen med. Wochenschrift 1884, No. 48 bis 50.

durch Dampf sicher sterilisirt und nach dem Abkühlen geimpft und zum Theil bei Zimmer-, z. Theil bei Brütofentemperatur gehalten; eventuell ist auch auf Anaerobiose Rücksicht zu nehmen. Durch Impfungen sterilisirter Milch ist zu sehen, ob Bakterien das Caseïn durch Säurebildung zur Gerinnung bringen, oder ob sie das Caseïn labähnlich ausscheiden und das ausgeschiedene Caseïn lösen.

Durch Impfungen von Milchzucker- oder Rohrzucker-lösungen wird ermittelt, dass Bakterien Disaccharate verwerthen, wobei besonders darauf zu achten ist, ob dabei diese Disaccharate erst in die einfachen Saccharate gespalten werden. Durch Uebertragungen auf Stärkelösungen und Stärkekleister wird erkannt, dass die Bakterien Stärke lösen und in Zucker überführen oder nicht. Bei diesen Versuchen ist dem Zucker resp. der Stärke in einzelnen Gläsern nichts, in anderen 1 p. M. Fleischextract und in einer dritten Reihe 1 p. M. Fleischextract und 0,5 p. C. Pepton zuzusetzen.

Bei höheren Organismen sind alle derartigen hydrolytischen Spaltungen, wie sie durch Diastase, Pepsin, Lab u. s. w. ausgeübt werden, ziemlich sicher zurückzuführen auf chemische Fermente,

**Enzyme,**

welche von den dieselben producirenden Zellen getrennt werden können und dann auch ausserhalb des Organismus Hydratationen[1]) bewirken. Wenn durch Bakterien derartige Hydratationen ausgeübt werden, ist durch Versuche direct zu ermitteln, ob diese Processe von den Bakterien trennbare, ächte Enzymwirkungen sind, oder ob dieselben nicht von der lebenden Zelle isolirt werden können. Von Krukenberg wurden Hydratationen ohne trennbare Enzyme bei niederen Thieren sicher gestellt; ich vermochte die Hydratation des Milchzuckers durch die Milchsäurebacillen nicht von diesen Bakterien zu trennen und eine neuere Angabe von Hansen über directe alkoholische Gährung von Rohrzucker durch einen Schimmelpilz ohne Abscheidung von Invertin ist wohl in demselben Sinne zu deuten. Es liegt nicht der geringste Grund vor jede durch Bakterien aus-

[1]) Kühne: Erfahrungen und Bemerkungen über Enzyme und Fermente. Untersuch. des physiologischen Instituts der Universität Heidelberg, Bd. I, Heft 3, 1877.

geübte Hydratation ohne weiteres als Wirkung eines trennbaren, isolirbaren, ächten Enzyms aufzufassen, sondern es sind hierüber nur directe Versuche entscheidend. Die Einzelheiten dieses Nachweises gehören wesentlich in das Gebiet der Chemie.[1]) Der allgemeine Gang beruht darauf, dass durch Alkohol die Enzyme mit den Albuminaten niedergerissen werden; dann werden dieselben mit Glycerin oder Wasser aufgenommen und dadurch von den Albuminaten getrennt, und dies event. wiederholt. Diese Proceduren müssen in sterilisirten Lösungen gemacht werden, welche mit Reinkulturen geimpft waren und zu einer Zeit, in der noch keine Sporen gebildet sind. Weigert[2]) hatte schon früher gefunden, dass Glycerin für diese Zwecke bisweilen im Stiche lässt, und ich fand, dass Alkohol und Glycerin[3]) zur sicheren Trennung der Enzyme nicht immer ausreichen, besonders wenn Sporen vorhanden sind.

Auch durch Filtration kann man versuchen Enzyme von der bakterienhaltigen Flüssigkeit zu trennen. Bei den Experimenten über Enzyme ist es unbedingt nöthig, durch controlirende Reinkulturen, besonders Plattenkulturen, zu ermitteln, ob nicht trotz aller Vorsicht Bakterien mit übertragen wurden.

Während bei den parasitischen Bakterien im engeren Sinne die Uebertragung selbst, die Infection, geknüpft ist an die Uebertragung der Bakterien, kann die Wirkung als solche vielleicht trennbar sein dadurch, dass diese Bakterien isolirbare Enzyme oder basische, alkaloidähnliche Körper,

**Ptomaine**

bilden, welche die eigentliche Giftwirkung ausüben. Durch Bildung solcher giftiger Producte aus den Albuminaten können selbst Fäulnissbakterien Intoxicationen ausüben, ohne dass sie wirkliche Infectionskrankheiten bewirken. Der Nachweis derartiger Gifte erfolgt zum Theil wie bei andern Enzymen, zum Theil deckt er sich mit dem Nach-

---

[1]) cfr. A. Mayer: Die Lehre von den chemischen Fermenten 1882.

[2]) Ueber Glycerin als Unterscheidungsmittel geformter und ungeformter Fermente. Deutsche med. Wochenschrift 1877, No. 40/41.

[3]) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte, Bd. II, 1884, S. 343.

weis der Alkaloide nach dem Verfahren von Stas-Otto[1]), zum Theil sind die Methoden noch auszuarbeiten, wie dies besonders von Brieger[2]) in der letzten Zeit geschehen ist.

Während ein grosser Theil der bis jetzt betrachteten biologischen Aufgaben nur von dem chemisch geschulten Forscher gelöst werden kann, restiren noch einige fundamentale Aufgaben wesentlich experimenteller Art.

### Verhalten zur Temperatur.

Es ist zu ermitteln, bei welcher niedersten Temperatur eine reinkultivirte Bakterienart anfängt sich zu vermehren, zu Colonien auszuwachsen. Man impft zu diesem Zwecke am besten Gelatine in Reagirgläsern und sterilisirte Lösungen mit Reinkulturen und setzt die Gläser wochenlang in den Eisschrank, dessen Temperatur im Allgemeinen nicht unter 5° sinkt und 8° nicht übersteigt. Temperaturen über 8° bis zur Zimmertemperatur erreicht man am besten in kühlen Zimmern, in Gefässen mit doppelten Wandungen, durch welche fortwährend kaltes Leitungswasser circulirt. Für Temperaturen über 15° bis zur Bluttemperatur können bei Einschaltung eines Gasdruckregulators schon die gewöhnlichen Vegetationskästen dienen. Am meisten empfiehlt sich für ganz genaue Bestimmungen der Thermostat nach d'Arsonval, Fig. 28. Derselbe besteht aus einem doppelwandigen Cylinder von starkem Kupferblech, welcher unten in der doppelwandigen conischen Heizfläche endigt. Der geneigte Abschluss des Cylinders von $M^1$ nach M gestattet die Beseitigung aller Luft und vollständige Füllung des ganzen Mantels W mit Wasser. Man füllt den Mantel mit destillirtem oder Regenwasser von einer der gewünschten annähernd gleichen Temperatur vollständig bis $M^1$, setzt dann die Steigröhre S auf, in der das Wasser eine bestimmte Höhe einnimmt. Das durch einen Druckregulator von dem Druck in der übrigen Leitung unabhängige Gas strömt bei a ein, tritt durch die Oeffnung $a^1$ in die kleine Kammer h, von hier bei b wieder aus und gelangt von b durch eine Rohr-

[1]) Otto: Anleitung zur Ausmittlung der Gifte, 4. Aufl., 1884. — Ludwig: Medicinische Chemie 1885.

[2]) Ueber Ptomaine 1885.

verbindung nach c und dann zu den Flammen d. Diese werden durch einen Mantel von Marienglas gegen Zug geschützt und können als Stichflammen nicht zurückschlagen. Zwischen dem Raume h und dem Wassermantel W ist ein Schlösing'scher Membran-Regulator m—m eingespannt. Bei Temperaturschwankungen des im Wassermantel W sich befindenden Wassers macht sich die Zusammenziehung oder Ausdehnung der grossen Wassermenge in der engen Steigröhre durch relativ starkes Fallen oder Steigen bemerkbar. Dadurch ändert sich aber der auf dem Wasser lastende Druck relativ stark und die Kautschukmembran m—m wird entsprechend bald mehr nach dem Wasser vorgebaucht, bald der Ausströmungsöffnung des Gases, $a^1$, fester aufgedrückt. Es strömt dementsprechend bald mehr Gas durch $a^1$ in den Raum ein, bald weniger, und in Folge dessen brennen die Flammen bald stärker resp. schwächer bis die Temperatur wieder erreicht ist, auf welche der Apparat eingestellt war. Die Regulirung ist auf Zehntel eines Grades innerhalb mehrerer Wochen genau, wenn der Stand des Wassers in der Steigröhre täglich controlirt und durch Nachfüllen einiger Tropfen destillirten Wassers oder Wegnahme einiger Tropfen regulirt wird, wenn der Gasdruck unabhängig ist vom Gasdruck der Hausleitung, und der Raum, in dem der Apparat steht, eine gleichmässige Temperatur besitzt. Bei grösseren Temperaturschwankungen des Raumes ist es nöthig, den Apparat noch mit einem Asbestmantel zu umgeben.

Fig. 28.

Mit Hülfe eines Thermostaten ist das Temperatur-Optimum zu ermitteln, d. h. diejenige Temperatur, bei welcher die Bakterien sich am intensivsten vermehren und wirken. Man impft zu diesem Zwecke Nährgelatine resp. Agar-Agar oder festes Blutserum mit den Reinkulturen und ermittelt die Zeit, innerhalb welcher deutliche, characteristische Colonien sich bilden. Dann impft man sterilisirte Nährlösungen in Reagirgläsern und Erlenmeyer'schen

Kölbchen mit den Reinkulturen und ermittelt durch von Zeit zu Zeit vorgenommene Prüfungen, bei welcher Temperatur das Maximum der Wirkung, z. B. ein bestimmter Säuregrad in kürzester Zeit erreicht wird. Das Optimum der Temperatur für Vermehrung und Wirkung schwankt bisweilen nur innerhalb weniger Grade, zeigt oft aber auch eine grosse Breite. Jenseits des Optimums folgt wieder eine Abnahme der Wachsthums- und der Wirkungsintensität. Zur Ermittlung dieser Grenze impft man die Reinkulturen sowohl in feste Medien, als in zusagende Flüssigkeiten. So ermittelte ich z. B., dass die Vermehrung und Wirkung der Milchsäurebakterien zwischen 45,3 und 45,5 ° C. in Milch und 3 bis 4 % igen Zuckerlösungen aufhört, ohne dass aber eine Tödtung der Bakterien erfolgte. Diese Grenze bezeichnet zunächst nur eine Entwicklungshemmung, eine Art Wärmestarre, oberhalb der erst die eigentliche Vernichtung der Bakterien erfolgt.

Nachdem im Februar 1880 Pasteur die Entdeckung mitgetheilt hatte, dass durch biologische Eingriffe die Mikrokokken der Hühnercholera in ihrer Virulenz abgeschwächt werden, und dass Impfungen mit diesen abgeschwächten Bakterien die Thiere gegen Impfungen mit virulentem Material schützen, ermittelte Toussaint, dass man virulentes Milzbrandblut durch 10 Minuten langes Erwärmen auf 55 ° oder durch Zusatz von Carbolsäure in seiner Virulenz herabsetzen kann, und Pasteur fand bald darauf, dass man durch Kultiviren der reinen Milzbrandbacillen in Bouillon bei 42 bis 43 ° die Virulenz dieser Bakterien systematisch herabzusetzen vermag. A. Chauveau[1]) ermittelte dann, dass bei 52 ° 15 Minuten, bei 50 ° 20 Minuten, bei 47 ° 3 bis 4 Stunden, bei 43 ° etwa 6 und bei 42 ° fast 20 Tage zum selben Grade der Abschwächung erforderlich sind, dass aber die Sicherheit und die Constanz der Abschwächung um so grösser ist, je niedriger die Temperatur ist. Koch, Gaffky und Löffler[2]) präcisirten diese Ermittelungen noch genauer für die Temperaturen zwischen 42 und 43 °.

Derartige feine Abstufungen der Temperatur sind nur mit einem

---

[1]) Comptes rendus. T. 96, 1883, No. 9, 10 und 11.

[2]) Mittheilungen aus dem K. Gesundheitsamte, Bd. II, 1884, S. 147.

vorzüglichen Thermostaten zu erreichen. In ähnlicher Weise ist zu ermitteln, bei welchen unteren und oberen Temperaturen sich Sporen bilden und unter- und oberhalb welchen Temperaturen keine Sporen gebildet werden. Innerhalb dieser Grenzen ist das Optimum der Temperatur für die Sporenbildung dadurch zu ermitteln, dass man die Menge der Sporen, die Regelmässigkeit ihrer Bildung in den Kulturen beobachtet und die Zeit feststellt, zu der sich die ersten Sporen finden. Auch die zum Auskeimen erforderliche Zeit ist unter verschiedenen Temperaturverhältnissen zu ermitteln.

Diese Ermittelungen über die niedrigste Temperatur, bei welcher eine Bakterienart eben noch sich vermehren kann; über die Höhe und Breite des Temperatur-Optimums und über die obere Temperatur, bei welcher eine Art nicht mehr wirkt; ferner die Beobachtungen über die unteren und oberen Temperaturen, bei denen keine Sporenbildung mehr eintritt, und die Ermittelungen über das Optimum zur Sporenbildung und die zur Sporenauskeimung erforderliche Temperatur gestatten fast allein schon den Grad der Anpassung an die parasitische Lebensweise richtig zu beurtheilen.

Wenn man bei den Reinkulturen die Schwierigkeit oder Leichtigkeit der Herstellung berücksichtigt, wenn man beachtet, ob die rein kultivirten Bakterien in Betreff ihres Stickstoff- und Kohlenstoffbedarfes wählerisch sind oder nicht, wenn man die geschilderten Temperaturverhältnisse eingehend prüft, dann wird die Reinkultur zu einem epidemiologischen Experimente unter reinen Bedingungen. Der Experimentator kann sich durch diese Ermittelungen gegen einseitige contagionistische Deutungen des Thierexperimentes ganz direct schützen und unbefangen an die Beurtheilung der örtlich-zeitlichen Hülfsursachen für das Entstehen von En- und Epidemien herantreten.

Um die Temperatur genauer festzustellen, bei welcher Sporen getödtet werden, verfährt man am besten so, dass man ein recht tiefes Wasserbad mit constantem Niveau anwendet, auf dessen Boden sich eine Holzplatte zum Schutze gegen die directe Wirkung des heissen Bodens befindet. Oben wird das Bad mit einem Deckel verschlossen, welcher zur Einführung einiger verschieden tief einzu-

senkender Thermometer und zur Aufnahme von Reagirgläsern mit sterilisirter Nährlösung mehrere Oeffnungen hat. Das Wasser des Bades muss höher stehen als das Niveau der Flüssigkeit in den Gläsern, in denen die Temperatur etwas niedriger bleibt wie im Wasserbade, so dass die ermittelten Zahlen nicht genau den wirklich in den Gläsern erreichten Temperaturen entsprechen. Wenn der Temperaturausgleich angenommen werden kann, nach ca. $^1/_2$ Stunde, werden die Gläser unter schnellem Oeffnen mit den Sporen geimpft und wiederholt hin und her bewegt. Man lässt die Gläser bei verschiedenen Temperaturen, z. B. Siedetemperatur, 95°, 90° bis 70° verschieden lange Zeit, bringt dann einige Gläser in das Temperaturoptimum der betreffenden Art, um durch Auftreten oder Ausbleiben von Trübungen auf die Tödtung zu schliessen. Den Inhalt anderer Gläser kann man mit Gelatine mischen und zu Plattenkulturen verwenden. Zum Studium der Temperatur über 100° bedient man sich für diese Ermittelungen am besten der Salz- oder Oelbäder.

Auch die Sporen können vor der Tödtung eine Abschwächung erfahren, was durch Uebertragungen auf zusagende Lösungen oder Thiere festzustellen ist.

Um den Einfluss trockner Hitze zu ermitteln, tränkt man kurze Stückchen Seidenfäden mit einer sporenfreien und andere mit sporenhaltiger Bakterienflüssigkeit, indem man die Fäden in eine Aufschwemmung der entsprechenden Reinkulturen in destillirtem Wasser einlegt, oder in das frische bakterienhaltige Blut oder den Gewebssaft einbringt. Dann trocknet man die Fäden im Exsiccator, legt sie in Uhrgläser und setzt sie im Trockenschranke verschieden hohen Temperaturen direct aus.

Je nach der Art der Einwirkung der Temperaturen kann sich, wie erwähnt, eine einfache Entwickelungshemmung, oder eine Abschwächung der Virulenz, oder endlich eine Vernichtung der Bakterien bemerkbar machen.

Ausser der Temperatur wirken viele Mittel, je nach der Concentration, entwickelungshemmend, antiseptisch, oder abschwächend, oder tödtend, desinficirend.[1]) Die Versuche über

[1]) Koch: Ueber Desinfection. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1881, Bd. I., S. 234.

**Desinfection mit Flüssigkeiten**

stellt man derart an, dass man Uhrgläser, Krystallisationsschalen oder Reagirgläser mit einer Lösung des zu prüfenden Mittels in verschiedenen Concentrationsgraden füllt und in einzelne imprägnirte Seidenfäden mit, in andere Fäden ohne Sporen einbringt.

Nach verschieden langer Einwirkung nimmt man die Fäden mit sterilisirter Pipette aus den Lösungen, spült sie mit sterilisirtem Wasser ab und bringt 3 bis 4 Fäden in zähflüssige, auf Objectträger aufgetragene Nährgelatine resp. andere erprobte Nährmedien. Zur Controle bringt man Fäden in Gelatine, welche gar nicht weiter behandelt wurden, und andere, welche nur mit sterilisirtem Wasser abgespült waren. Die Differenzen in der Zeit der Entwickelung oder das gänzliche Ausbleiben kann man dann direct beobachten. Eine weitere Controle ist erforderlich dadurch, dass man Thieren solche Seidenfäden unter die Haut bringt. Carbolsäure tödtete z. B. die Milzbrandbacillen in 1%iger Lösung in 2 Minuten, während Milzbrandsporen erst durch eine 3%ige Lösung und erst in 7 Tagen vernichtet wurden. Die Entwickelung der Milzbrandsporen wurde durch eine 2%ige Lösung in 3 Tagen gehemmt. Chamberland und Roux[1]) ermittelten den abschwächenden Einfluss der Carbolsäure, indem sie zu neutralisirter Kalbsbouillon, welche mit Milzbrandbacillen versetzt war, bestimmte Mengen des Mittels hinzufügten; $^1/_{400}$ Carbolsäure hielt die Entwickelung auf und tödtete die Bacillen in 48 Stunden, $^1/_{500}$ tödtete erst nach 5 Monaten, $^1/_{600}$ tödtete erst nach 6 Monaten. Bei $^1/_{600}$ tödteten die Bacillen nach 12 Tagen nur noch Meerschweinchen und Kaninchen (u. Mäuse) und waren nach 29 Tagen unwirksam. Zusätze bis zu $^1/_{800}$ hoben die Sporenbildung auf, welche erst bei $^1/_{1200}$ wieder eintrat.

Zu Laboratoriums-Versuchen über

**die Desinfection mit Gasen**

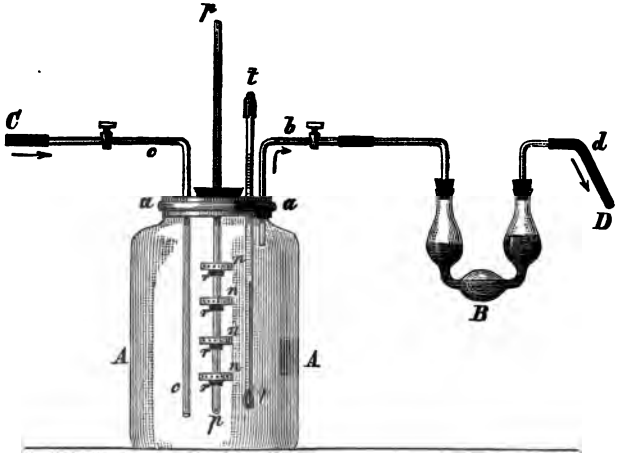
empfiehlt sich folgende Versuchsanordnung nach Fischer und Proskauer.[2]) Ein dickwandiger Glasballon, AA, von ca. 20 l

[1]) Comptes rendus, Bd. 96, 1883, Nr. 15.

[2]) Ueber die Desinfection mit Chlor und Brom. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Bd. II. 1884, S. 228.

Rauminhalt, wird mit einer starken Kappe, a a, von vulcanisirtem Kautschuk verschlossen, deren Rand durch eine Schnur straff an den Flaschenhals angedrückt wird. In der Kappe findet sich central eine grössere und rings um diese noch einige kleinere Durchbohrungen,

Fig. 29.




welche sämmtlich mit Kautschukpfropfen verschlossen werden können. Die mittlere (5 bis 6 cm breite) Durchbohrung dient zum Einführen der Objecte. Die Versuchsobjecte werden, um den Gasen von allen Seiten den Zutritt zu gewähren, in siebartig durchlöcherte Paraffinnäpfchen n gelegt. Diese Näpfchen, deren Durchmesser zur bequemen Einführung etwas geringer ist als der der Durchbohrung, werden an einem Glasstabe, p p, befestigt, welcher durch die Mitte ihres Bodens hindurchgeht, so dass mehrere solcher Näpfchen übereinander angebracht werden können. Durch schmale Gummiringe, r, wird ein Abgleiten vom Glasstabe verhütet. Der Glasstab selbst sitzt fest in einem Kautschukstöpsel, der genau die grosse centrale Oeffnung verschliesst. Das rechtwinklige, bis fast auf den Boden reichende Glasrohr, c c, führt das nach den Regeln der Chemie im Apparate C entwickelte Gas in den Glasballon, dessen Temperatur durch das Thermometer, t, gemessen wird. Durch das dicht unter der Kappe endigende Glasrohr b kann zur Untersuchung jederzeit Gas entnommen werden, wenn man den Aspirator D in Thätigkeit setzt, mit dem man abgemessene Volumina Luft entnehmen kann. Das Gas wird

in B durch eine Absorptionsflüssigkeit geleitet, in der der Gehalt des abgesaugten Luftvolumens an Gas maassanalytisch bestimmt wird.

Bei Desinfectionsversuchen in Flüssigkeiten und Gasen setzt man das an Seidenfäden angetrocknete sporenfreie und sporenhaltige Material frei der Einwirkung dieser Medien aus, um den unmittelbaren Effect rein zu beobachten. Zu anderen Versuchen verpackt man das Material in Fliesspapier, in ausgehöhlte Kartoffeln etc., um die natürlichen, erschwerenden Bedingungen nachzuahmen.

Um den Einfluss des

**Austrocknens**

zu studiren, bringt man einen Tropfen Kulturflüssigkeit mit Bakterien auf ein Deckglas, lässt den Tropfen, gegen Staub geschützt, eintrocknen, dann bringt man nach Stunden oder Tagen und Wochen einen Tropfen der Kulturflüssigkeit auf das eingetrocknete Präparat und legt das Deckglas mit dem hängenden Tropfen in eine feuchte Kammer. Die durch das Eintrocknen herbeigeführte Erschöpfung des Nährbodens macht sich unter sonst günstigen Bedingungen auf Milzbrandbacillen dadurch bemerkbar, dass dieselben in den Fäden Sporen bilden, welche selbst nach Monaten bei Zusatz der Nährlösung wieder auskeimen. Bei Choleravibrionen dagegen bilden sich keine Sporen, sondern es tritt nur als Zeichen der Erschöpfung des Nährbodens eine spirillenähnliche Fadenbildung, aber keine Sporenbildung ein; dadurch wirkt die Austrocknung in einiger Zeit gleichzeitig tödtend, so dass später bei Zusatz der Nährlösung keine Bildung dieser Bakterien mehr eintritt.

Die direct oder in ihren Sporen abgeschwächten parasitischen Bakterien können vielleicht einen Schutz gegen die virulenten Bakterien verleihen. Wenn die Versuchsthiere die Impfung mit dem abgeschwächten Material überstanden haben, werden sie in kürzeren oder längeren Intervallen mit dem virulenten Materiale inficirt, wobei die Technik selbst sich nicht ändert.

**Die Einwirkung starker Kältegrade und hohen Druckes**

auf die Bakterien ist nur mit besonderen Apparaten zu studiren. Bis jetzt gehen die Angaben noch derart auseinander, dass ich mich mit Andeutung dieses Gebietes begnügen muss. Der Wunsch, dass auch diese Seite der Methodik bald etwas besser bearbeitet wird, ist begründet durch die Angabe der Existenz aerobiotischer Bakterien

in beträchtlichen Meerestiefen und die Resistenz von Bakterien gegen entsprechenden künstlich hervorgerufenen Druck[1]) bis zu 1000 Atm. Hierher gehören auch die Angaben von Chauveau und Wossnessenski[2]), dass Drucksteigerung erst abschwächend und bei gewisser Höhe tödtend auf Milzbrandbacillen wirkt. Während die Resistenz vieler Bakterien gegen das Einfrieren bei leichter Frosttemperatur sichergestellt ist und durch Aussetzen der geimpften Lösungen oder der Reinkulturen im Winter leicht (sonst event. durch Kältemischungen) geprüft werden kann, schwanken die Angaben über die äussersten Temperaturen unter 0° beträchtlich. Pictet und Yung[3]) geben als untere Grenze 108 Stunden bei — 70° und 20 Stunden bei — 130° an.

**Die Electricität**

ist nach Cohn und Mendelsohn[4]) in Form der physiologisch wirksamen Inductionsströme auf Bakterien in Flüssigkeiten ohne Wirkung. Die Wirkung des constanten Stromes auf die Vermehrung von Bakterien in Nährlösungen sowohl, als auf die Entwickelung von Micrococcus prodigiosus an der Oberfläche von Kartoffeln hing ab von der Stromstärke und war zurückzuführen auf die electrolytische Wirkung des Stromes.

**Die Phosphorescenz**

der Bakterien hat Ludwig[5]) versucht, durch einen Mikrospectralapparat zu bestimmen, und Engelmann[6]) fand, dass die Schwärmbewegungen des bacterium photometricum abhängig sind

**vom Lichte**

und dass im Sonnenspectrum die Ansammlung der Zellen am stärksten im Ultraroth ist und durch Grün oder Blau nach dem Violett hin immer mehr abnimmt.

---

[1]) Certes, Comptes rendus Bd. 98, S. 690 und 745, Bd. 99, S. 385.

[2]) Comptes rendus Bd. 98, S. 314.

[3]) Comptes rendus Bd. 98, S. 747.

[4]) Beiträge zur Biologie. Bd. III, Heft 1, S. 141.

[5]) Ueber spectroskopische Untersuchung photogener Pilze. Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie 1884. Bd. I, S. 181.

[6]) Arch. f. d. ges. Physiologie 1883. Bd. 30, S. 95.

# VI. Specielle hygienische Untersuchungen.

## A. Boden.

Durch Schlösing und Müntz[1]) war zuerst experimentell erwiesen worden, dass im Boden das aus dem Zerfalle organischer Substanzen sich bildende Ammoniak durch die Thätigkeit von Bakterien in Salpetersäure übergeführt werden kann. Die Oxydation des Kohlenstoffs der organischen Substanzen zu Kohlensäure wurde von Wollny[2]) gleichfalls experimentell auf Mikroorganismen zurückgeführt. Umgekehrt findet in den Bodenschichten mit Beschränkung des Luftzutritts eine Reduction der Nitrate durch Bakterien statt, wie Gayon und Dupetit[3]) fanden, wobei bald nur Nitrite, bisweilen aber Stickstoff, Ammoniak, Stickoxydul sich bilden. Diese Experimente stellt man derart an, dass man in sterilisirte schwach alkalische Nährlösungen oder Abwässer, welche Ammoniaksalze, Nitrite resp. Nitrate enthalten, eine Spur Erde einträgt, während man zur Controle in andere Gläser Erde bringt, welche durch mehrstündiges Erhitzen bei 150 bis 160° sterilisirt war. Zu den Reductionen wendet man die Versuchsanordnung über Anaerobiose an.

Hierdurch wurden die ersten positiven Grundlagen für das biologische Verständniss der bis dahin rein hypothetischen Grundwassertheorie geliefert.

Der directe Nachweis, dass im Boden aber auch pathogenetische Organismen, resp. deren Sporen vorhanden

---

[1]) Comptes rendus. Bd. LXXVII, 1877, S. 203 und 353; Bd. LXXXIV. S. 301; Bd. LXXXIX, S. 891.

[2]) Landw. Versuchsstationen, Bd. XXV, 1880, S. 390.

[3]) Comptes rendus, 1882, Bd. LXXXXV, S. 644 und S. 1365.

sein können, wurde 1881 von Pasteur und Koch[1]) für die Bacillen des malignen Oedems gebracht, und Nicolaier[2]) kultivirte aus Erde eine Bacillenart, welche bei Mäusen, Kaninchen und Meerschweinchen tödtlichen, auf andere Thiere übertragbaren Tetanus hervorrief.

Solche Ermittlungen lassen ein genaueres Studium der im Boden vorhandenen Bakterien wünschenswerth erscheinen, weil in demselben facultative Parasiten bei genügender Feuchtigkeit und Temperatur sämmtliche Existenzbedingungen finden, während facultative Saphrophyten wenigstens zeitweilig im Boden fortkommen können. Die obligat parasitischen Bakterien können wenigstens in ihren Dauerformen im Boden conservirt werden.

Um über die Anwesenheit von Bakterien oder entwicklungsfähigen Keimen derselben im Boden möglichst umfassenden Aufschluss zu erhalten, bedient man sich aus den früher dargelegten Gründen am vortheilhaftesten der Gelatineplattenkulturen von Koch, in denen sämmtliche saprophytischen Bakterien und die bis jetzt bekannten facultativen Parasiten und facultativen Saprophyten sich bis zu isolirbaren Colonien entwickeln können. Da einzelne der in der Erde schon nachgewiesenen Organismen, wie die Oedem- und Buttersäurebacillen, anaerobiotisch sind, so überdeckt man einzelne Gelatineplatten mit einer Glimmerscheibe. Zu beachten ist auch, ob die entwickelten Arten Sporen bilden und ob bei einer gewissen Tiefe nur noch sporenbildende Bakterien angetroffen werden. Man verreibt die Bodenprobe in einer sterilisirten Reibschale mit einem sterilisirten Pistill und streut von dem feinen Staube mit einem sterilisirten Skalpell auf eine noch zähflüssige Gelatine, welche auf eine Platte ausgegossen ist.

Man kann auch von dem Boden einige feine Partikel in die noch im Reagirglase befindliche, verflüssigte Gelatine eintragen, durch Schütteln vertheilen und dann die so inficirte Gelatine auf die Platte bringen. Die Controle erfolgt dadurch, dass man andere, sonst ebenso behandelte Platten in derselben Weise mit Bodenpar-

[1]) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 56.

[2]) Ueber infectiösen Tetanus. Deutsche med. Wochenschrift 1884, No. 52.

tikelchen inficirt, welche aber durch zweistündiges Erhitzen auf 150 bis 160° sterilisirt waren.

Streng obligat parasitische Bakterien können sich im Boden nur in Dauerform finden und man kann dieselben aus dem Boden wohl nur ausnahmsweise einmal direct kultiviren. In der Regel bedarf es des Umweges durch die Infectionsmethode, um ein möglichst reines Ausgangsmaterial für Blutserumkulturen zu gewinnen. Man bringt von dem Boden in eine oder mehrere Hauttaschen und inficirt dann mit dem Eiter, dem Blute oder Gewebssafte der erkrankten Thiere andere. Nach einigen Uebertragungen werden dann die Thiere in ihren Geweben oder im Blute Reinkulturen der malignen Art darstellen und man kann dann in der früher geschilderten Weise Blutserumkulturen anlegen, wie es auch von Nicolaier mit Erfolg geschehen ist.

## B. Wasser.

Die chemische Wasseruntersuchung kann allein keinen Anhalt für den hygienischen Werth oder Unwerth eines zu Nutz- und Trinkwasser bestimmten Wassers bieten. Das chemisch reinste Wasser, das destillirte Wasser der Laboratorien z. B., enthält immer Bakterien und deren Keime, und umgekehrt kann chemisch ziemlich unreines Wasser relativ wenig Mikroorganismen enthalten. Von den chemischen Stoffen behält der Typus der Stadtlaugenstoffe, das Chlornatrium, als Index der Verunreinigung bei Vergleichen mit guten Bezugsquellen immer seinen Werth und ebenso die Nitrite, weil sie aus den vorher geschilderten Gründen einen Anhalt dafür geben, dass das Wasser mit Oertlichkeiten in Verbindung steht, in denen biologische Processe noch nicht zur Ruhe gekommen sind, sei es dass die Nitrite durch Oxydation oder Reduction entstanden sind. Bei Emanzipirung von den Grenzzahlen und sorgfältiger Beachtung der localen Verhältnisse wird man aber auch mit den übrigen chemischen Ermittlungen nach wie vor werthvolle Aufschlüsse auch für den hygienischen Werth des Wassers erhalten.

Aber nicht nur die löslichen Stoffe der biologischen Processe im Boden können sich dem Wasser beimischen, sondern auch die

Organismen selbst. A priori liegt nicht die geringste Ursache vor, nur dem Grundwasser oder vielmehr der durch dasselbe veranlassten Durchfeuchtung des Untergrundes Wichtigkeit für die Entstehung und Verbreitung von Infections-Krankheiten beizumessen und das Nutz- und Trinkwasser für diese Vorgänge als gleichgültig hinzustellen. Die Ermittelungen der localistischen Forschung haben für beide Möglichkeiten Anhaltspunkte beigebracht.

Die directe mikroskopische Untersuchung erfolgt sowohl im hängenden Tropfen als in Deckglas-Trockenpräparaten. Durch Kulturversuche ist einerseits die Zahl der entwicklungsfähigen Keime festzustellen und zweitens zu ermitteln, ob sich unter denselben pathogene Arten befinden.

Das Wasser wird in sterilisirten Gefässen aufgefangen, mit sterilisirter, abgekühlter Pipette 1 ccm entnommen und in einem Reagirglase mit ca. 10 ccm bei 30° C. verflüssigter 10%iger Nährgelatine gut gemischt. Dann wird die Mischung auf eine sterilisirte Platte ausgegossen, welche nach dem Erstarren der Gelatine in eine feuchte Glocke kommt.

In diesen Plattenkulturen können die streng obligat parasitischen Bakterien nicht zur Entwicklung kommen. Es werden also niemals zu viel Keime gezählt werden können. Für die Hygiene ist dies insofern gleichgültig, als es sich bei der Anlage oder Verbesserung von Wasserleitungen in erster Linie darum handelt, zu wissen ob das Wasser event. pathogene Mikroorganismen führt, welche auch ausserhalb des thierischen Körpers existiren können.

Ist das Wasser sehr reich an Keimen, so muss es in bestimmter Weise mit 10, 50, 100 bis 1000 ccm sterilisirtem, destillirtem Wasser verdünnt werden. Aus practischen Gründen, um direct vergleichbare Zahlen zu gewinnen, empfiehlt es sich nach Koch[1]) die Zahl der entwicklungsfähigen Keime auf ein Cubikcentimeter des ursprünglichen Wassers zu berechnen. Taf. I, Fig. 4 gibt die Zahl der aus einem Cubikcentimeter unverdünnten Wassers zur Entwicklung gelangten Colonien.

[1]) cfr. auch Becker's Anleitung zur Untersuchung des Wassers auf Mikroorganismen. Börner's Reichs-Medicinal-Kalender für 1885, Heft II.

Durch die Art ihrer Entwicklung suspecte oder unbekannte Formen sind durch Uebertragungen auf Versuchsthiere auf maligne Eigenschaften zu prüfen.

Kann das zu untersuchende Wasser direct geholt werden, so füllt man es am besten in sterilisirte Kolben, welche sofort mit sterilisirtem Wattepfropf verschlossen werden. Zum weiteren Transport empfiehlt sich folgendes Verfahren. Kleine cylindrische, mit eingeschliffnem Glasstöpsel versehene Flaschen von ca. 100 ccm Inhalt werden im Laboratorium gründlich gereinigt und bei 150 bis 160° sterilisirt. Dann wird eine im Wasserdampf sterilisirte Gummikappe über den Stöpsel fest übergezogen und das Gefäss mit Kappe in einer kleinen Holzbüchse eingeschlossen. Zur Entnahme von Wasser aus einer Röhrenleitung lässt man das Gefäss, nachdem das Wasser erst einige Minuten ausgelaufen ist, unter der Leitung voll laufen, während Gummikappe und Stöpsel mit sterilisirten Fingern gehalten werden, setzt dann den Stöpsel fest auf, zieht die Gummikappe über und schliesst in die Büchse ein.

Zur Entnahme aus einer Quelle nimmt man die Gummikappe ab, öffnet den Glasstöpsel erst im Wasser, setzt ihn nach ca. einer Minute wieder auf, zieht die Kappe über, trocknet äusserlich ab und schliesst das Gefäss in die Büchse ein; auf diese Weise wird jede Infection ausserhalb des Wassers vermieden.

Die Zahl der sich entwickelnden Colonien ist nicht immer gleich; besonders ist jede Temperatursteigerung mit einer Vermehrung der Zahl der Keime verbunden; schon eintägiges Stehen in einem warmen Zimmer ist hierauf von Einfluss. Ebenso wie die Zahl der entwickelten Keime schwankt auch die Zahl der differenten Arten beträchtlich. Die Beurtheilung der bakteriologischen Seite einer Wasseruntersuchung setzt eingehende Studien über die Bakterien voraus.

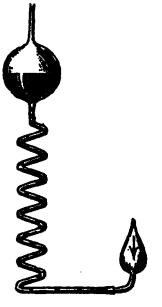
## C. Luft.

Pasteur liess, um den Gehalt der Luft an Keimen zu ermitteln, Luft durch Schiessbaumwolle streichen, löste dann die Schiessbaumwolle in Aether und untersuchte die Lösung mikroskopisch.

Miquel[1]) versuchte, unter Verbesserung früherer Apparate, Mikroorganismen, ausser den Bakterien, direct zu zählen. In einer nach unten offenen Glocke ist ein hohler Kegel eingeschraubt, der an der Spitze eine feine Oeffnung besitzt; dieser Oeffnung gegenüber befindet sich in der Glocke ein mit Glycerin und Glycose bestrichenes Deckglas. Wird die Luft in die Glocke aspirirt, so muss dieselbe an dem Deckglase vorbeistreichen und gibt ihren Staub an die klebrige Flüssigkeit ab, welche dann direct mikroskopisch untersucht werden kann. Zur Zählung der Bakterien liess Miquel gemessene Volumina Luft durch sterilisirte, neutralisirte Lösungen von Fleischextract gehen.

Eine Verbesserung der „Aeroskope" für Flüssigkeiten brachte Emmerich.[2]) Ein birnförmiges Glas, Fig. 30, communicirt durch eine feine Oeffnung mit einer 70 bis 80 cm langen Glasröhre, welche in etwa 7 sanft ansteigenden parallelen Windungen zu einer Glaskugel führt. Der Apparat wird mit 20 bis 25 ccm Nährlösung beschickt und durch Aspiration Luft durchgesaugt, welche in feinen Bläschen von der Eingangsöffnung aus auf langem Wege durch die Spirale geht, sodass die Luft in innigen Contact mit den Lösungen kommt und deshalb ihre Keime leicht an die Flüssigkeit abgeben kann.

Fig. 30.



Da auch bei vollständiger Absorption der Keime durch die als Waschflüssigkeit dienenden sterilisirten Nährlösungen eine isolirte Entwicklung der Keime und damit eine directe Zählung unmöglich ist, hören alle Aeroskope mit Verwendung von Flüssigkeiten da auf, wo man eigentlich anfangen will. Eine Möglichkeit die mit Keimen beladenen Flüssigkeiten auf ihren Gehalt an Keimen direct zu prüfen wird ermöglicht, wenn man diese Lösungen mit steriliisrter Nährgelatine mischt und auf Platten ausgiesst, so dass sich dann in der Gelatine die einzelnen Keime isolirt zu Colonien entwickeln können.

Nachdem Koch[3]) die Verwerthbarkeit der Nährgelatine auch

[1]) Annuaire de l'observatoire de Montsouris.

[2]) Archiv für Hygiene, Bd. I, 1883, S. 169.

[3]) Mittheilungen a. d. K. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 32.

für die Luftuntersuchungen im Princip festgestellt hatte, construirte Hesse[4]) folgenden Apparat, welcher aus einer langen Glasröhre und einem Aspirator besteht. Die Glasröhre B, Fig. 31, besitzt eine Länge von etwa 70 cm und einen Durchmesser von 3,5 cm.

Fig. 31.

Das Ende a wird mit einer mit centralem, runden Ausschnitte versehenen straff schliessenden Gummikappe verschlossen und über diese eine zweite ebensolche Kappe gezogen, welche aber keinen Ausschnitt besitzt und deshalb nach aussen vollständig abschliesst. Das Ende b wird mit einem fest schliessenden Gummipropfe versehen, in dessen centraler Durchbohrung ein ca. 1 cm weites, 10 cm langes Glasrohr steckt, dessen freies Ende mit den Aspiratoren A, $A^1$ verbunden wird. In dieses Glasrohr werden zwei Wattepfröpfe eingepresst, von denen einer mehr central liegt, während der andere nach innen zu etwas in das Lumen der Röhre hineinragt.

Unter Entfernen des Gummipfropfs füllt man 50 ccm sterilisirte 5 bis 10%ige Nährgelatine ein, verschliesst das Ende wieder und setzt die Röhre mit Gelatine noch einmal 1 bis 2 Stunden den heissen Dämpfen aus. Nachdem die Röhre soweit abgekühlt ist, dass man sie gut halten kann, kleidet man die ganze Innenfläche der Röhre B mit einer feinen Schicht Gelatine aus, während der Boden, auf dem sich die Keime fast ausschliesslich ansiedeln, mit der grösseren Menge Gelatine bekleidet wird.

Zu diesem Zwecke kühlt man die Röhre unter der Wasserleitung ab, indem man sie in horizontaler Lage in ihrer ganzen Länge successive unter die Leitung bringt und sie dabei schnell um ihre Axe dreht. Ist die Gelatine nur noch ganz zähflüssig, so hört man plötzlich mit dem Drehen auf und bewegt sie nur noch horizontal; dadurch entsteht an einer Stelle in der ganzen Länge eine etwas stär-

[4]) Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen. Mittheilungen Bd. II, 1884, S. 182.

kere Schicht, welche beim Aufspannen auf das Gestell als Bodenschicht nach unten kommt.

An der Beobachtungsstelle nimmt man die äussere, undurchbohrte Kappe bei a ab, setzt den Aspirator in Thätigkeit und saugt langsam Luft durch. Bei Versuchen im Freien kann man 2 calibrirte 1-Literflaschen als Aspirator verwenden.

Einerseits um dem Einwande zu begegnen, dass auf der Gelatineoberfläche nicht alle Keime haften, besonders aber zum Improvisiren eines Apparates, welcher die Vortheile der gelatinirten Substanzen mit einer Waschflüssigkeit vereinigt, kann man folgendermaassen verfahren. Sterilisirte Reagirgläser werden mit einem durch Dämpfe sterilisirten doppelt durchbohrten Kautschukpfropf versehen; in beiden Durchbohrungen stecken sterilisirte rechtwinklig gebogene Glasröhren, deren eine unmittelbar unter dem Pfropf endigt, während die andere bis fast auf den Boden geht. Die so armirten Gläser werden mit Nährgelatine oder nach von Sehlen[1]) mit Agar-Agar gefüllt, welche sicher sterilisirt sind. Die freien Enden der Glasröhren sind durch sterilisirte Wattepfröpfe geschlossen, welche erst am Orte der Entnahme entfernt werden. Die Gelatine wird durch Einsetzen in Wasser von 30°, das Agar-Agar durch 40° verflüssigt und während der Aspiration bei dieser Temperatur in Lösung gehalten, so dass sie wie eine Nährlösung die Keime annehmen. Der Vorsicht halber muss man 2 bis 3 solcher Gläser mit einander verbinden, da selbst bei mässigen Luftmengen das erste Glas der Luft nicht alle Keime entzieht. Nach Abbrechen des Versuches werden die Wattepfröpfe wieder aufgesetzt und die Lösungen durch Herausnehmen aus dem warmen Wasserbade zum Erstarren gebracht. Um jede weitere, in diesem Falle störende Luftinfection zu vermeiden, lässt man die Keime sich in den Reagirgläsern isolirt entwickeln.

[1]) Studien über Malaria. Fortschritte der Medicin 1884 No. 18.

## VII. Die Bakteriologie als Lehrgegenstand.

Wenn die bis jetzt entwickelten Methoden zur Erforschung der Bakterien die Bedeutung gewinnen sollen, welche die Gesammtheit der Aerzte diesen Dingen zuspricht, so müssen unsere Hochschulen die Gelegenheit zum Erlernen dieses wichtigen Gebietes geben.

Bis jetzt geschieht dies aus Mangel an geeigneten Lehrkräften und Instituten aber noch in einer durchaus ungenügenden Weise. Der Universität Kopenhagen gebührt das grosse Verdienst bahnbrechend vorgegangen zu sein und im April 1883 im Anschlusse an das botanische Institut ein Institut für medicinische Bakteriologie, wenn auch in bescheidener Weise, eingerichtet zu haben, dessen Leitung sich in den bewährten Händen von Salomonsen befindet. Von den deutschen Universitäten bietet bis jetzt nur München im Anschlusse an das pathologische Institut, Göttingen im hygienischen und Breslau im botanischen Institute Gelegenheit zur Erlernung der Methoden. Hierzu kommt noch die von mir geleitete hygienisch-bakteriologische Abtheilung des chemischen Instituts von Fresenius zu Wiesbaden, welche besondere Rücksicht auf die Lehrthätigkeit nimmt. Das Laboratorium des Kaiserlichen Gesundheits-Amtes ist nur im dienstlichen und diplomatischen Wege zugänglich, so dass es für allgemeine Lehrzwecke leider gar nicht in Frage kommt.

Der Eifer, mit dem aber an allen Hochschulen jetzt auf diesem Gebiete gearbeitet wird, würde unendlich fruchtbarer sein können und manches Fiasco wäre zur Unmöglichkeit geworden, wenn in einer den bestehenden Bedürfnissen genügenden Weise Gelegenheit zum Einarbeiten in den Methoden geboten wäre. Die Frage, wie solche

Institute einzurichten sind, wird augenblicklich aus Mangel an geeigneten Lehrkräften uud aus pecuniären Gründen wohl kaum in allseitig genügender Weise zu beantworten sein.

Die Botanik ist bei der Lösung vieler morphologischer und biologischer Fragen der Bakteriologie interessirt, seit das geflügelte Wort eines hervorragenden Botanikers so kläglich zu Schanden geworden ist, dass ein ordentlicher Botaniker sich überhaupt nicht mit Bakterien beschäftige. Diese Fragen könnte man ruhig den botanischen Instituten überlassen, an denen ja kein Mangel vorhanden ist.

Die Physiologie kann sich bei dem gegenwärtigen Stande der Verdauungslehre unmöglich beruhigen, sondern muss den biologischen Prozessen im Darm eine ganz andere Beachtung schenken als bisher. Die Lösung dieser Aufgaben, welche sich zum Theil mit denen der Gährungsphysiologie decken, könnte man schliesslich den reich dotirten physiologischen und physiologisch-chemischen Instituten überlassen.

Auch die mit Instituten genügend versehene Pathologie wird nicht umhin können, unter den vielen „Reizen", mit denen sie zu thun hat, den Bakterien als einem äusseren Reize grössere Beachtung zu schenken, als dies noch vielfach geschieht.

Wem es bei der Bakterienforschung wirklich um die Sache zu thun ist, wird sich nur freuen, wenn der Gegenstand von den verschiedensten Seiten in Angriff genommen wird. Aber solche divergente Gesichtspunkte für die Forschung genügen nicht, wenn es sich darum handelt der Bakteriologie als Lehrgegenstand die gebührende Stelle zu geben.

Für eine definitive Gestaltung scheinen mir nur zwei Wege Aussicht auf dauernden Erfolg zu versprechen. Einmal könnte man besondere bakteriologische Institute errichten wie in Kopenhagen, oder man sollte diese Institute in Verbindung bringen mit den zu errichtenden hygienischen Instituten. Das letztere scheint mir der am meisten versprechende Modus zu sein.

Botanik, Physiologie und Pathologie haben immer nur an bestimmten Seiten der Forschung ein actuelles Interesse, während sie den übrigen Fragen viel gleichgültiger gegenüberstehen.

Für die Hygiene haben die botanischen Fragen ein eingehendes Interesse, weil die Stellung im Systeme, Artconstanz, Variabilität etc. ganz direct von Einfluss auf das hygienische Handeln werden können. Dieses botanische Interesse theilt die Hygiene zum Theil mit der Physiologie und Pathologie.

Die Hygiene muss die allgemeine Biologie der Bakterien genau kennen, weil die allgemeinen Zersetzungsvorgänge durch saprophytische Mikroorganismen für die Aetiologie von Bedeutung sind. Dieses Interesse theilt sie zum Theil mit der Botanik und Physiologie.

Die Hygiene muss mit den pathogenen Bakterien eingehend vertraut sein, weil dieselben für die Aetiologie nicht nur den Werth irgend eines externen „Reizes" haben, sondern weil sie als conditio sine qua non einen Angelpunkt der ganzen Aetiologie bilden, auf welche die Pathologie nur in ungenügender Weise Rücksicht nehmen kann, weil die Vorgänge im Körper ihre Thätigkeit genügend in Anspruch nehmen.

Die Aufgaben, die experimentell eruirbaren Ermittelungen über die Krankheitsparasiten mit den Ergebnissen über die Hülfsursachen der epidemischen Krankheiten zu verbinden, die Hypothesen der Grundwasser- und Trinkwassertheorie an der Hand der Biologie der Mikroorganismen auf Thatsachen und nicht mehr ausschliesslich auf Reflexionen und Wahrscheinlichkeitsrechnung zu basiren, fallen der Hygiene allein zu und sind in genügender Weise nur zu lösen bei Beherrschung aller Seiten der Forschung, von welcher Botanik, Physiologie und Pathologie doch nur einzelne Theile genügend berücksichtigen.

Aus diesen Ueberlegungen scheint mir hervorzugehen, dass derjenige Wissenszweig, welcher aus inneren Gründen fortlaufend dem ganzen Gebiete Rechnung tragen muss, am ersten im Stande ist dem Gegenstande als Lehrgegenstand in vollem Umfange

gerecht zu werden. Wie man von dem Hygieniker einer anderen Richtung verlangen muss, dass er sich mit der Bakteriologie soweit vertraut macht, um sie lehrend vortragen zu können, so muss man auch von dem mit der Hygiene betrauten Bakteriologen verlangen, dass er die anderen Kapitel der Hygiene zur Lehre genügend beherrscht. Die Hygiene kann und darf nicht in der Bakteriologie aufgehen und nichts würde verkehrter sein, als bei Besetzung von Lehrstellen der Hygiene nur die bakteriologische Richtung zu berücksichtigen. Aber als Lehrgegenstand dürfte die Bakteriologie, wenn man von besonderen Instituten absieht, sich am practischsten mit der Hygiene vereinigen lassen.

Bei dem Unterrichte in den Methoden hat man selbstverständlich zwei Dinge auseinanderzuhalten: Die Einführung in die Methoden durch practische Kurse und das selbstständige Arbeiten nach vorausgegangener Orientirung. Diese letztere Seite wird nur von wenigen specieller Interessirten gepflegt werden, muss aber bei der Einrichtung der Institute genügend berücksichtigt werden. Das eigentliche Tagesbedürfniss liegt zur Zeit aber mehr in den orientirenden Kursen. Jeder practische Arzt, vor Allem jeder Medicinalbeamte hat den Wunsch, nachdem die morphologischen und biologischen Grundlagen der allgemeinen Zersetzungsvorgänge und der Aetiologie der Infectionskrankheiten durch Ausbildung der Methoden greifbarere Gestalt gewonnen haben, sich über diese Methoden soweit zu informiren, um den neueren Forschungen mit Verständniss folgen zu können.

Diese Kurse lassen sich in Form von etwa 4 bis 6wöchentlichen practischen Uebungen halten, in denen unter besonderer Rücksicht auf die hygienisch wichtigen Methoden an einigen Schulfällen die wichtigsten Methoden eingeübt werden. Dieser Modus dürfte zur Zeit allein im Stande sein den Bedürfnissen der Medicinalbeamten und Militärärzte zu genügen, welche nicht länger als einige Wochen abkommen können. Für den Lehrer ist dieser Modus weit weniger angenehm, als wenn er die practische Einführung in die Methoden über ein Semester vertheilen kann.

Dieser letztere Modus, der für die jüngeren Mediciner und Naturforscher sich zur Regel ausbilden muss, gestattet dem Lehrer alle Methoden zu berücksichtigen und dadurch den Blick für die Entwickelung und die zukünftigen Aufgaben der Forschung zu schärfen. In Folge dessen wird diese Art der Einführung in die Methoden zu einem eminenten Lehrmittel, welches für das selbstständige Arbeiten ausgiebig vorbereitet und bewirken kann, dass allmählich die voreiligen Mittheilungen auch in der Bakteriologie ganz verschwinden.

# Erklärung der Abbildungen.

## Tafel I.

Fig. 1. Objectträgerkultur von Milchsäurebakterien im durchfallenden Lichte in natürlicher Grösse, Text S. 106. Die kleinen weissen Punkte zeigen das isolirte Wachsthum im Impfstriche im Inneren der Gelatine, während die grösseren sich berührenden kreisförmig begrenzten Flecke das Oberflächenwachsthum auf der Gelatine erkennen lassen.

Fig. 2 bis 4 sind sorgfältig nach Photogrammen gegeben und so gezeichnet, wie die Kulturen in der gelben Gelatine auf dunklem Untergrund im reflectirten Lichte erscheinen. Zur Illustration der Methoden konnte die Photographie leider nicht ausgiebig verwendet werden. Auch im Texte musste ich auf die Darstellung dieses wichtigen Hülfmittels verzichten, welches eingehende practische Uebungen und theoretische Studien an der Hand besonderer Lehrbücher voraussetzt.

Fig. 2. Theil des Impfstriches einer die Gelatine verflüssigenden Bakterienart, b. subtilis, bei ca. 20facher Vergrösserung. An den beiden dunkleren centralen Stellen ist die Verflüssigung schon stark in die Tiefe gedrungen.

Fig. 3. Theil des Impfstriches einer die Gelatine nicht verflüssigenden Bakterienart, b. lactis, bei ca. 20facher Vergrösserung. Die Colonien 1 sind meist noch vollständig isolirt im Inneren der Gelatine. Die aus einem Luftkeime entstandene Colonie 2 ist an einer Stelle über den Impfstrich hinübergewachsen.

Fig. 4. Plattenkultur in natürlicher Grösse; Text S. 109. Die Colonien sind aus 1 ccm Wasser bei Zimmertemperatur gewachsen. Die Colonien 1 verflüssigen die Gelatine schnell, wie in Fig. 2; in einzelnen derselben sieht man überwucherte Colonien durchschimmern; bei 1a haben sich zwei derartige Colonien berührt. Die Colonien 2 verflüssigen die Gelatine langsam, trichterförmig; bei 2a berühren sich eben zwei derartige Colonien. Die Colonien 3 entsprechen einer die Gelatine nicht verflüssigenden, an der Oberfläche schnell in Form porzellanartig glänzender Köpfchen wachsenden Kokkenart. Die Colonien 4 stellen eine die

Gelatine nicht verflüssigende langsam wachsende Art dar. Bei 3a haben sich Colonien von 3 und 4 berührt. Die meisten Colonien sind trotz der enormen Zahl von Keimen, aus denen sie hervorgegangen sind, noch derart isolirt, dass mit Hülfe schwacher Trockensysteme die Trennung der verschiedenen Formen sicher gelingt.

## Tafel II.

Fig. 5. Stichkultur in Gelatine. Text S. 113. Kokken der Pneumonie; die Gelatine hat in den obersten Schichten einen leicht bräunlichen Ton angenommen.

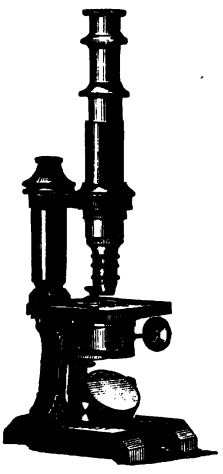
Fig. 6 und 7. Reinkulturen von Tuberkelbacillen auf Blutserum nach Koch; Text S. 118. Das Blutserum ist in den untersten dicken Schichten bei a nur eben durchscheinend, in den oberen dünnen Schichten bei $a^1$ vollständig klar; das Condensationswasser hat sich zwischen b und $b^1$ angesammelt. Die Kulturen sind etwas zu grob gezeichnet. In der Fig. 6 der Profilansicht ist das Uebergreifen der Kultur bei $b^1$ auf die Oberfläche der Flüssigkeit nicht ganz richtig wiedergegeben. In der Figur 7, Flächenansicht, hat die Kultur die Flüssigkeit nicht erreicht.

Fig. 8. Tuberkulöses Sputum; Text S. 45. Die Tuberkelbacillen blau, die Kerne und übrigen Bakterien, zwei Arten Kokken und eine Art Bacillen braun.

Fig. 9. Sporenfärbung; Text S. 56. Die Sporen der Milzbrandbacillen roth, die einzelnen Bacillen noch kräftig, die Fäden schwach blau gefärbt.

Fig. 10. Doppelfärbung eines Schnittes; Text S. 65. Miliartuberkulose. Riesenzelle mit blau gefärbten Tuberkelbacillen.

Neuestes und bestes



# Arbeits-Mikroskop für Aerzte

(auf Wunsch und nach Angabe erster Autoritäten construirt)

mit

**Abbé'schem Beleuchtungs-Apparat**

und

**homogener (Oel-) Immersion**

(zur Bacterien-Untersuchung)

**mit 3 Objectiven: 1, 3 und $^1/_9$" homogen und 2 achromatischen Ocularen 0 und 2**

in Mahagonikasten mit Handgriff

**complet 150 Mark.**

**Vergrösserungen linear: 20, 40, 75, 150, 300 und 600 Mal.**

---

**Dasselbe mit noch 1 Objectiv Nr. 7 = 180 Mark.**

---

## Grössere Mikroskope

mit **Abbé'schem Beleuchtungs-Apparat** und **homogenen Objectiven** von 300 bis 500 Mark.

---

## Einzelne homogene (Oel-) Immersions-Objective:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $^1/_9$" | (Vergrösserung | mit | Ocular | 0—300 Mal) | **90 Mk.** |
| $^1/_{12}$" | ( « | « | « | 400 « ) | **120 Mk.** |
| $^1/_{18}$" | ( « | « | « | 600 « ) | **200 Mk.** |
| $^1/_{24}$" | ( « | « | « | 800 « ) | **300 Mk.** |

---

Tuberkel-Bacillen-Präparate à Stück 2 Mark

(Sputum und Lunge)

Cholera-Bacillen-Präparate à Stück 5 Mark

(asiatica und nostras)

empfiehlt

## F. W. Schieck, Optisches Institut

**Berlin SW., Hallesche Str. 14.**

(Errichtet 1819). (12 erste Medaillen).

# Dr. ROBERT MUENCKE,

**Technisches Institut für Anfertigung naturwissenschaftlicher Apparate & Geräthschaften.**

Vollständige Einrichtungen und Ergänzungen chemischer Laboratorien.
Lager chemischer und physikalischer Apparate und sämmtlicher Utensilien für den Laboratoriumsbedarf.

**Specialität:**

## Apparate und Utensilien zur Untersuchung von Mikro-Organismen.

Complete Einrichtungen
bakteriologischer und physiologischer Laboratorien.

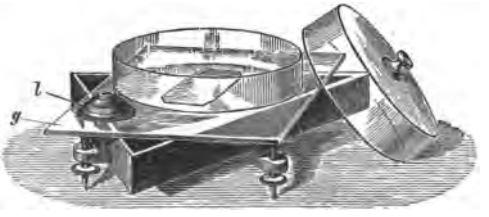
**Glasgefässe für naturwissenschaftliche Museen u. Sammlungen.**

**Lager aller**

Utenslien zu mikroskopischem Gebrauche.

58 Luisenstr. **BERLIN NW.,** Luisenstr. 58.

**neben dem kaiserlichen Reichs-Gesundheits-Amt.**




**Ausführliche illustrirte Preisverzeichnisse.**

**Billigste Bezugsquelle**

von

Dr. Rob. Koch's Nährböden.

**Vorschriftsmässige Bereitungsweise garantirt.**

Fig.1.

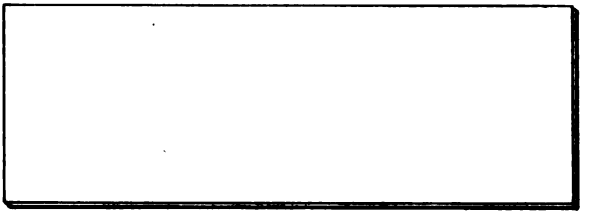


Fig.2.

Fig.3.

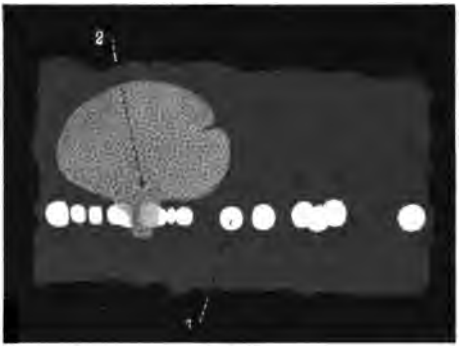
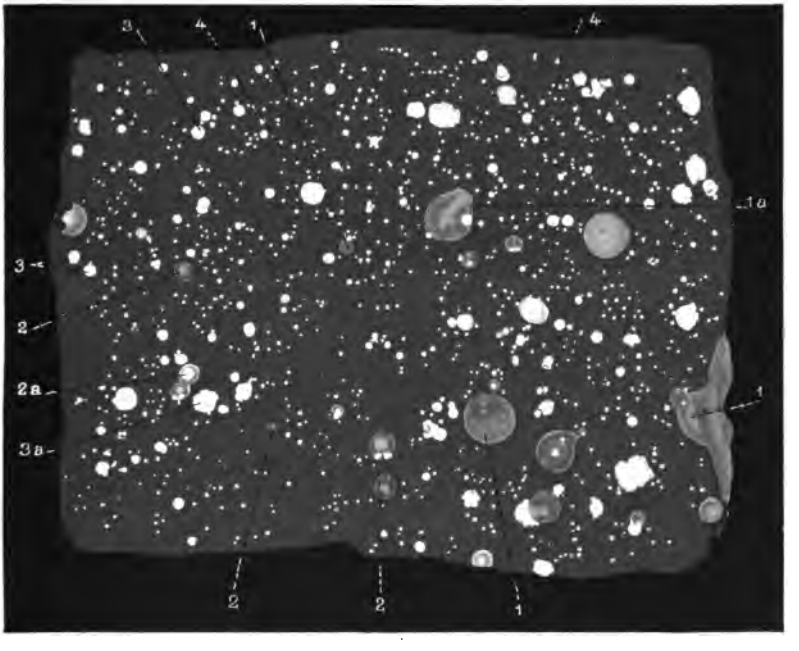



Fig.4.




Lith. Anst. v. C. Kirst, Leipzig.

Fig. 5.

Fig 6

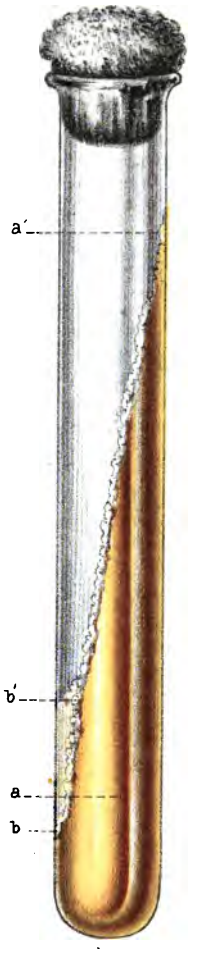



Fig. 7.

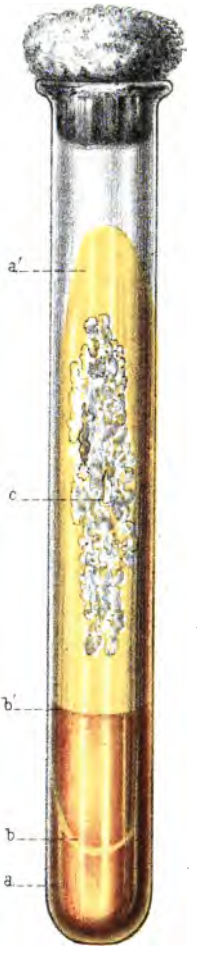



Fig. 8.

Fig. 9.

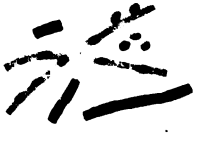


Fig. 10.

Lith. Anst. v. C. Kirst. Leipzig.

# Sämmtliche Apparate & Utensilien

sowie die erforderlichen

## Nährflüssigkeiten

zur Untersuchung der

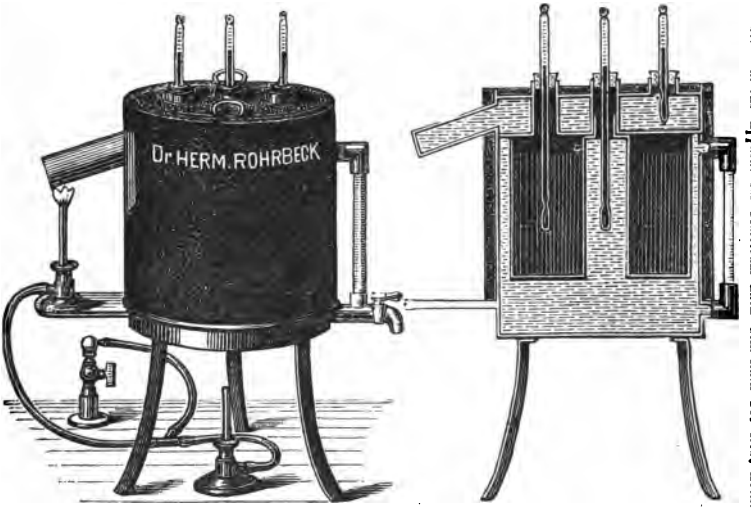
# Mikroorganismen

nach dem von Herrn **Geh.-Rath Dr. Robert Koch** im

## Kaiserl. Deutschen Reichs-Gesundheits-Amt

angewandten Verfahren liefern

Sterilisations-Apparat für Blutserum nach Geh.-Rath Dr. Rob. Koch.




Sterilisations-Apparat für Blutserum nach Geh.-Rath Dr. Rob. Koch.

prompt in **exactester** Ausführung zu mässigen Preisen

## Dr. Hermann Rohrbeck,

Firma:

## J. F. Luhme & Co.,

## Berlin NW. Friedrichstr. 100.

Ausführliche Cataloge auf Wunsch gratis und franco.

**Sämmtliche mikroskopische Utensilien.**

# J. Klönne & G. Müller

Institut für Herstellung achromatischer Mikroskope
und mikroskopischer Präparate

**Prinzenstr. 71 Berlin S. Prinzenstr. 71**

Hof parterre.

Wir halten stets die wichtigsten

**Pathogenen Spaltpilze**

in tadellosen Reincultur- und Schnittpräparaten vorräthig.

Ausserdem empfehlen wir unsere **reichhaltige Auswahl** von Präparaten der Pflanzen- und Thierparasiten, Algen, Protozoen, Diatomeen (in Sammelpräparaten, Test- und Typenplatten, letztere systematisch geordnet und genau bestimmt), Moose, Hölzer, Pflanzen- u. Thierhistologie, Pathologie und Embryologie, Strahlenthiere, Weichthiere, Würmer, Insekten, Spinnen, Droguen, Krystalle, Nahrungsmittel, Gespinnstfasern, Gerbstoffe, Papierstoffe, Brauereistoffe etc.

---

Als zu bakteriologischen Untersuchungen geeignetes Instrument empfehlen wir unser

**Mikroskop, Katalog V. Nr. 14,**

ausgestattet mit Oel-Immersion $^1/_{12}$ und Abbé'schem Beleuchtungs-Apparat. — **Preis 300 Mark.**

Ferner:

**Ausrüstung zur Spaltpilzuntersuchung** nach Gaffky. Enthaltend alle von Letzterem in Börner's Kalender 1884 angegebenen Materialien und Utensilien in polirtem Kasten. — **Preis 25 Mark.**

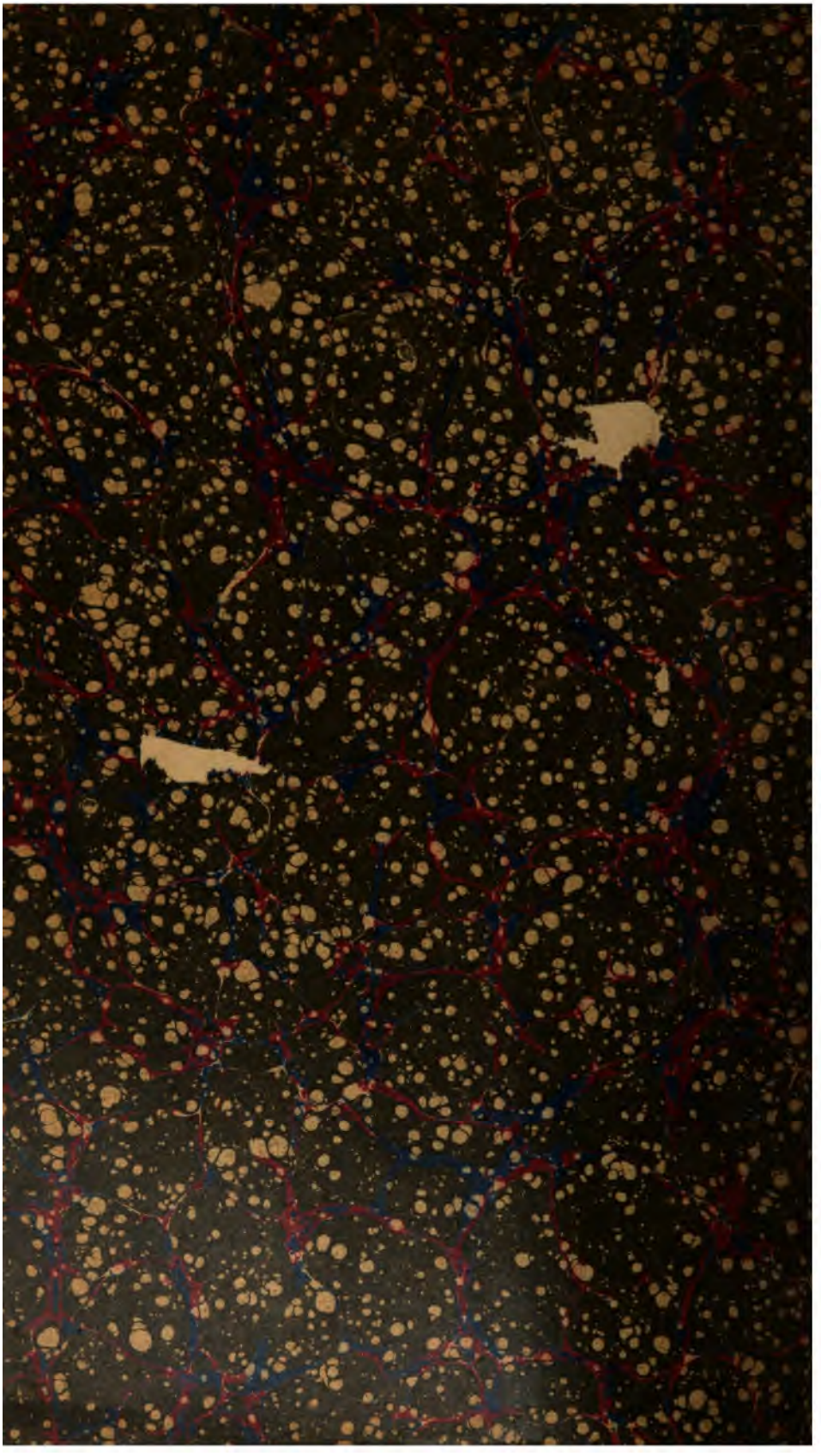
**Bacteriensucher.** Ein auf den Objekttisch aufzulegender Apparat, mit dem man ein Präparat systematisch nach einem kleinen Objekt durchforschen kann, ohne etwas zu übersehen, wobei Abbé'sche Beleuchtung und schärfste Systeme angewandt werden können. — **Preis 20 bis 30 Mark, in Etui 5 Mark mehr.**

**Objekt-Markirer.** Mit Hülfe dieses Apparates kann das aufgefundene kleine Objekt durch einen Ring auf dem Deckglas markirt werden. Es geschieht dies durch einfachen Druck. — **Preis 6 Mark.**

---

**Preisverzeichnisse versenden wir gratis und franco.**

*Buchdruckerei von Carl Ritter in Wiesbaden.*



YC 88540

Micr. Soc.
QR65
H8

BIOLOGY
LIBRARY
G

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY